



تحقیقی

اثر مینوسایکلین بر اختلالات رفتاری-شناختی القا شده توسط ایسکمی سرتاسری مغزی

محمد خواجه نوری^۱، دکتر مسعود فریدونی^{۲*}^۱ کارشناسی ارشد زیست شناسی گرایش فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.^۲ استاد فیزیولوژی (علوم اعصاب)، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: سکته مغزی یکی از عوامل اصلی مرگ و میر و ناتوانی در سطح جهانی به شمار می‌رود. مسمومیت ناشی از تحریک، التهاب عصبی، استرس اکسیداتیو و نیتروژاتیو ناشی از ایسکمی / رپرفیوژن مغزی منجر به مرگ سلولی، ادم مغزی و اختلالات شناختی-رفتاری مانند اختلال در حافظه کوتاه مدت و حافظه بلند مدت می‌شود. این مطالعه به منظور تعیین اثر مینوسایکلین بر اختلالات رفتاری-شناختی القا شده توسط ایسکمی سرتاسری مغزی انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه تجربی روی ۵۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار ۲۸۰-۲۲۰ گرمی در دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. حیوانات به‌طور تصادفی در گروه کنترل، گروه حلال، گروه جراحی، گروه جراحی + ایسکمی/رپرفیوژن، گروه جراحی + ایسکمی/رپرفیوژن و گروه‌های دریافت کننده مینوسایکلین (تجویز داخل صفاقی) در دوزهای ۴۵ mg/kg/bw، ۲۲/۵۰ و ۱۱/۲۵ تقسیم شدند. در زمان‌های مشخص پس از جراحی القا ایسکمی / رپرفیوژن، به منظور القا ایسکمی / رپرفیوژن مغزی سرتاسری از روش جراحی و مسدودسازی شریان‌های کاروتید به مدت زمان ۲۰ دقیقه استفاده شد. سی دقیقه پس از اتمام این روش، تزریق داخل صفاقی دارو یا حلال در روز صفر انجام شد. این تزریق‌ها به مدت هفت روز متوالی در یک ساعت خاص انجام شد. در روز هفتم، رفتار اضطراب با استفاده از Open-field سنجش شد. Y-Maze برای ارزیابی حافظه کوتاه مدت و Morris water maze برای ارزیابی حافظه بلند مدت قضایی و نیز ارزیابی حافظه معکوس در روزهای بعد استفاده شد.

یافته‌ها: در آزمون Y-maze، ایسکمی موجب کاهش ۳۳ درصد عملکرد حافظه کوتاه‌مدت شد ($P < 0/05$). مینوسایکلین با دوزهای ۲۲/۵ و ۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به ترتیب باعث بهبود ۲۰ درصد و ۲۵ درصد حافظه کوتاه مدت نسبت به گروه ایسکمی شد ($P < 0/05$). در آزمون فضای باز، ایسکمی موجب کاهش ۶۶ درصد حضور در مرکز میدان و افزایش اضطراب شد ($P < 0/05$). دوز ۴۵ mg/kg/bw مینوسایکلین اضطراب را ۳۲ درصد نسبت به گروه ایسکمی کاهش داد ($P < 0/05$). در آزمون Morris Water Maze، ایسکمی موجب افزایش زمان یافتن سکو در روزهای ۲ تا ۴ شد ($P < 0/05$). مینوسایکلین در دوزهای ۲۲/۵ mg/kg/bw و ۴۵ زمان یافتن سکو را به‌طور معنی‌داری کاهش داد ($P < 0/05$). در فاز معکوس آزمون Morris، ایسکمی موجب افت عملکرد حافظه بلندمدت شد ($P < 0/05$). مینوسایکلین در دوزهای ۱۱/۲۵ mg/kg/bw، ۲۲/۵ و ۴۵ عملکرد را به‌طور معنی‌داری بهبود داد ($P < 0/05$). در آزمون‌های پروب، ایسکمی موجب کاهش حضور در ربع هدف به میزان ۵۴ درصد در پروب ۱ و ۴۷ درصد در پروب ۲ شد ($P < 0/05$). دوز ۴۵ mg/kg/bw مینوسایکلین حضور در ربع هدف را در پروب ۱ به میزان ۴۵ درصد و در پروب ۲ به میزان ۳۴ درصد افزایش داد ($P < 0/05$). هیچ‌گونه تغییر آماری معنی‌دار در فعالیت‌های حرکتی بین گروه‌ها مشاهده نشد. نتیجه‌گیری: مینوسایکلین، به‌ویژه در دوزهای ۲۲/۵ و ۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌تواند عملکرد شناختی، حافظه و اضطراب را بدون ایجاد اختلال در فعالیت‌های حرکتی پس از ایسکمی مغزی بهبود بخشد.

واژه‌های کلیدی: مینوسایکلین، یادگیری معکوس، ماز آبی موریس، حافظه کاری، اضطراب

* نویسنده مسؤول: دکتر مسعود فریدونی، پست الکترونیکی: fereidoni@um.ac.ir

نشانی: مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، ۵۱-۳۸۸۰۵۵۰۹

وصول	۱۴۰۳/۱۱/۳۰	اصلاح نهایی	۱۴۰۴/۶/۲۱	پذیرش	۱۴۰۴/۶/۳۱	انتشار	In Press
------	------------	-------------	-----------	-------	-----------	--------	----------

مقدمه

اصلی ناتوانی در سنین بزرگسالی در آمریکا و پنجمین دلیل مرگ و میر این کشور است.^۱ ایسکمی به معنی توقف جریان خون است و بنابراین اکسیژن و مواد مغذی که منجر به شکست سلول‌های ساکن

سکته مغزی یک بیماری نسبتاً شایع بوده و به استناد مرکز ملی کنترل و پیشگیری بیماری‌های آمریکا سکته مغزی به عنوان علت

حیوانات در قفس‌های استاندارد با دمای اتاق کنترل شده (۲۲-۲۴ درجه سانتی‌گراد)، رطوبت ۵۰-۴۵ درصد و چرخه نور و تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند.

روش القا ایسکمی/ریپرفیوژن: سکنه مغزی گلوبال یا سرتاسری با کاهش یا قطع جریان خون به کل مغز شناخته می‌شود که در مدت زمان کوتاهی موجب بروز آسیب به نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ نیز می‌گردد و با افزایش مدت زمان سکنه آسیب وارده بیشتر خواهد شد.^۹ موش‌های صحرایی با تزریق داخل صفاقی زایلانین (۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم / کیلوگرم) بیهوش شدند. دمای بدن حیوانات حین جراحی تا زمان به هوش آمدن به دقت توسط یک ترمومتر تحت نظارت قرار گرفت و در محدوده ۳۸-۳۷ درجه سانتی‌گراد حفظ شد. سپس موش‌ها بر روی میز جراحی به خصوصی فیکس شدند. با استفاده از عینک مخصوص بزرگ بینی، ابتدا برشی به طول حدود یک سانتی‌متر به پوست جلوی گردن حیوان داده شد و سپس ماهیچه‌های این منطقه کنار زده شد و بعد سرخرگ‌های کاروتید مشترک از ماهیچه‌ها و عصب واگ با دقت جدا شد. در ادامه با استفاده از گیره هر دو شریان کاروتید به مدت ۲۰ دقیقه بسته شدند (دوره ایسکمی).^۹ پس از ۲۰ دقیقه گیره را برداشته تا جریان خون (دوره ریپرفیوژن) مجدداً برقرار شود.^{۱۰-۱۱} داخل بریدگی توسط سرم استریل شست و شو و ضدعفونی گردید و سپس زخم بخیه شد. از بتادین برای ضدعفونی کردن قسمت‌های خارجی زخم پس از بخیه زدن استفاده گردید. با استفاده از اشک مصنوعی از آسیب به چشم حیوان در مراحل جراحی و بیهوشی جلوگیری گردید. در این روش جریان خون وروی با مسدود کردن شریان‌های کاروتید به‌طور کامل قطع نمی‌شود؛ بلکه به دلیل وجود شریان‌های مهره‌ای و ساختار دایره‌ای ویلیس میزان خون لازم برای ادامه حیات حیوان به مغز خواهد رسید.^{۱۳} همچنین بیهوشی با کتامین و زایلانین موجب کاهش فعالیت مغز گردید که به نوبه خود شانس بقا حیوان را پس از القا ایسکمی افزایش می‌دهد.^{۱۴} حیوانات پس از به‌هوش آمدن به دقت مورد بررسی قرار گرفتند که هدف از این کار تایید القا ایسکمی در حیوانات بود. چنانچه حیوانات دارای تعدادی از موارد ذکر شده زیر بودند؛ برای انجام تست‌های رفتاری از آنها استفاده گردید.^{۱۵}

الف) تغییرات رفتاری و حرکتی مانند کاهش سطح هوشیاری یا خواب‌آلودگی بیش از حد پس از القا ایسکمی؛ کاهش پاسخ به محرک‌های محیطی (صوتی و لمسی) کاهش حرکت خودبه‌خودی (عدم تعادل و لرزش) به‌ویژه در مدل‌های شدیدتر؛ ب) اختلالات نورولوژیک قابل مشاهده مانند افتادگی پلک، تاخیر در واکنش‌های انعکاسی مانند واکنش پا یا دم؛ ج) کاهش مصرف آب و غذا.

منطقه ایسکمیک در حفظ و تولید آدنوزین تری فسفات (ATP) می‌شود که در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌گردد.^۲ به دلیل کاهش ATP، کلسیم سلولی افزایش می‌یابد. این مقدار اضافی در کلسیم به عنوان فعال‌کننده چندین مسیر عمل می‌کند و در نهایت منجر به فعال‌شدن آنزیم‌هایی به مانند فسفولیپاز می‌گردد که این فعال‌سازی باعث آسیب و تخریب غشای سلولی و غشای اندامک‌ها می‌شود و اکسیداز منجر به تولید رادیکال‌های اکسیژن آزاد و شروع آبشار التهابی می‌شود.^۲ در سیستم عصبی مرکزی و شبکه، گلوتامات که نقش مهمی در مرگ سلولی در اثر آزادسازی بی‌رویه دارد؛ در حین ایسکمی/ریپرفیوژن به مقدار زیادی آزاد می‌شود.^۲ آسیب‌های ریپرفیوژن به آن دسته‌ای از صدمات اطلاق می‌شود که در اثر برقراری مجدد جریان خون پس از قطع یا کاهش جریان خون در بافت (دوره ایسکمی) به‌وجود می‌آیند. در اثر نبود یا کاهش اکسیژن و مواد مغذی در بافت حین دوره ایسکمی، وضعیتی در بافت حاکم می‌شود که پس از برقراری مجدد جریان خون به‌جای بازگشت بافت به حالت طبیعی اولیه، وضعیت بدتر می‌شود.^۴

بروز ایسکمی/ریپرفیوژن در بافت مغز منجر به افزایش غلظت کلسیم داخل سلولی، دپلاریزه شدن ایسکمیک و خروج گلوتامات و سبب تشدید آسیب به سایر نواحی، افزایش رادیکال‌های فعال اکسیژن می‌شود که خود منجر به کموتاکسی سایر سلول‌های سیستم ایمنی به بافت و آزادسازی ROS بیشتر و عوامل التهابی از آنها می‌گردد. همچنین سبب افزایش میکروگلیاهای M2، از بین رفتن سدخونی مغزی در ناحیه درگیر، فعال‌سازی مسیر P38MAPK، فعال‌سازی مسیر NF-kB، فعال‌شدن گیرنده‌های مرگ که نهایتاً منجر به القا آپوپتوز می‌شوند. سبب خروج سیتوکروم C از سلول‌های درگیر حین مرحله ریپرفیوژن و منجر به القا مرگ سلولی می‌شود و باعث فعال شدن متالوماتریکس پروتئازها می‌گردد که توانایی بازسازی بافت را مختل می‌کند.^۵

مینوسایکلین به عنوان نسل دوم تتراسایکلین در سال ۱۹۷۲ توسعه یافت.^{۱۶} مینوسایکلین به‌طور گسترده‌ای در بدن توزیع می‌شود. به مقدار خیلی زیادی از سد خونی-مغزی عبور کرده و در بزاق نیز ترشح می‌شود. غلظت CSF مینوسایکلین می‌تواند به سطحی به اندازه ۳۵ درصد از غلظت مینوسایکلین سرم برسد.^۷ به حدود ۵۵-۸۸ درصد پروتئین پلاسما متصل می‌شود.^۸ این مطالعه به منظور تعیین اثر مینوسایکلین بر اختلالات رفتاری-شناختی القا شده توسط ایسکمی سرتاسری مغزی انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۵۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار ۲۲۰-۲۸۰ گرمی در گروه زیست‌شناسی دانشگاه فردوسی مشهد در سال ۱۴۰۲ انجام شد.

حافظه بلندمدت فضایی و نیز بررسی حافظه بلندمدت با تغییر استراتژی و یادگیری فضایی ادامه یافت.

ارزیابی میزان رفتار اضطرابی و فعالیت حرکتی با آزمون فضای باز (open-field) انجام شد. اولین بار این آزمون برای سنجش پاسخ‌های رفتاری مانند رفتار جستجوگرانه، فعالیت حرکتی، اندازه‌گیری میزان اضطراب و بیش‌فعالی استفاده گردید. میزان مسافت طی شده توسط حیوان به عنوان معیاری برای فعالیت حرکتی در نظر گرفته می‌شود.^{۱۶} همچنین به منظور سنجش میزان اضطراب، مدت زمان طی شده در ناحیه مرکز در نظر گرفته می‌شود و هرچه این زمان نسبت به زمان گذرانده شده در نواحی حاشیه‌ای بیشتر باشد؛ میزان اضطراب کمتر است.^{۱۷} حیوان به صورت آهسته به شکل تصادفی در یکی از چهارگوشه دستگاه رها شد و اجازه یافت به مدت ۵ دقیقه آزادانه به جست و جو پردازد. در طول این مدت، رفتار حیوان توسط یک دوربین (web cam) ضبط گردید و به‌وسیله نرم افزار ANY-maze مورد بررسی قرار گرفت.

برای بررسی عملکرد حافظه کوتاه مدت از آزمون ماز Y از طریق مشاهده و اندازه‌گیری رفتار تناوب خودبخودی در حیوان استفاده شد. برای انجام آزمون، حیوان به آرامی در انتهای یک بازو به شکل تصادفی قرار داده شد و سپس به آن اجازه داده شد تا به مدت هشت دقیقه آزادانه در بازوها به جست و جو پردازد. سپس از نسبت دوره‌های سه‌تایی صحیح به تعداد کل دوره‌های نه‌تایی دو ضربدر ۱۰۰ میزان تقریبی عملکرد حافظه کوتاه مدت به‌دست آمد.^{۱۸}

برای ارزیابی حافظه و یادگیری فضایی از ماز آبی موری (یادگیری فضایی و یادگیری فضایی معکوس) استفاده شد. در این آزمون حیوانات برای شنا کردن در یک محوطه استخر مانند به‌منظور پیدا کردن یک سکو که در زیر آب است؛ آموزش دیدند.^{۱۹} برای سنجش عملکرد حافظه در این پروژه از یک حوضچه با قطر ۱۵۰ سانتی‌متر استفاده گردید که رنگ داخلی آن مشکی و دمای آب در محدوده 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد حفظ گردید. از یک سکو با قطر حدوداً ۱۰ سانتی‌متر که به میزان تقریبی یک سانتی‌متر در زیر آب قرار داشت؛ استفاده شد. این سکو به‌منظور بررسی عملکرد حافظه فضایی در ربع شمال غربی (NW) قرار داده شد. به‌منظور جهت‌یابی و یادگیری فضایی، نشان‌هایی در چهار جهت ماز بر روی دیواره‌های اتاق (نشان‌های خارجی یا دور) و همچنین دیواره داخلی ماز (نشان‌های داخلی یا نزدیک) قرار گرفت. هر موش به‌صورت تصادفی از یکی از چهار ربع از سمت نزدیک به دیواره ماز رها شد تا سکوی مخفی زیر آب را پیدا کند. اگر چنانچه حیوان به هر دلیلی موفق به پیدا کردن سکو در حین یک دقیقه نشد؛ توسط دست راهنمایی و کمک شد تا بتواند سکو را پیدا نموده و سپس مدت ۱۵ ثانیه روی آن قرار گرفت. فرایند آموزش حیوانات در این ماز به

حیوانات به هشت گروه هفت تایی به شرح زیر تقسیم شدند. گروه کنترل (Control): این گروه شامل حیوانات سالمی بودند که هیچگونه مداخله‌ای دریافت نکردند.

گروه حلال (Solvent): حیوانات این گروه شامل حیوانات سالمی بودند که روزانه تنها مقدار مشخصی از حلال دارو (سرم فیزیولوژی)، متناسب با وزن بدن و مشابه شرایط دارودرمانی دریافت کردند. گروه جراحی (Surgery): در این گروه، حیوانات تحت عمل جراحی قرار گرفتند که مدت زمان بیهوشی و باز بودن ناحیه جراحی مشابه گروه‌های ایسکمی؛ اما بدون القای ایسکمی (عدم انسداد شریان‌های کاروتید) بود.

گروه القا سکته مغزی بدون دریافت دارو و حلال (Ischemia): ایسکمی مغزی از طریق انسداد شریان‌های کاروتید به‌مدت ۲۰ دقیقه با استفاده از گیره القا شد. هیچگونه دارو یا حلالی به حیوانات این گروه تزریق نشد.

گروه القا سکته مغزی با تزریق روزانه حلال (Ischemia+salin): ایسکمی مغزی از طریق انسداد شریان‌های کاروتید به‌مدت ۲۰ دقیقه با استفاده از گیره القا شد. حیوانات این گروه به‌صورت روزانه سرم فیزیولوژی دریافت کردند.

گروه القا سکته مغزی دریافت کننده داروی مینوسایکلین با دوز ۱۱/۲۵ mg/kg/bw: ایسکمی مغزی از طریق انسداد شریان‌های کاروتید به‌مدت ۲۰ دقیقه با استفاده از گیره القا شد. حیوانات این گروه به‌صورت روزانه و درون صفاقی داروی مینوسایکلین را با دوز ۱۱/۲۵ mg/kg/bw دریافت کردند.

گروه القا سکته مغزی دریافت کننده داروی مینوسایکلین با دوز ۲۲/۵۰ mg/kg/bw: ایسکمی مغزی از طریق انسداد شریان‌های کاروتید به‌مدت ۲۰ دقیقه با استفاده از گیره القا شد. حیوانات این گروه به‌صورت روزانه و درون صفاقی داروی مینوسایکلین را با دوز ۲۲/۵۰ mg/kg/bw دریافت کردند.

گروه القا سکته مغزی دریافت کننده داروی مینوسایکلین با دوز ۴۵ mg/kg/bw: ایسکمی مغزی از طریق انسداد شریان‌های کاروتید به‌مدت ۲۰ دقیقه با استفاده از گیره القا شد. حیوانات این گروه به‌صورت روزانه و درون صفاقی داروی مینوسایکلین را با دوز ۴۵ mg/kg/bw دریافت کردند.

بعد از سپری شدن ۳۰ دقیقه از اتمام جراحی دارو یا حلال به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. تزریق داخل صفاقی حلال یا دارو در همان ساعت تزریق روز جراحی تا شش روز بعد (در مجموع هفت روز تیمار) ادامه یافت. سپس هفت روز بعد از روز جراحی در روز هفتم ابتدا آزمون open-field و سپس آزمون y-maze انجام گردید و در ادامه از روز هشتم مراحل آزمون ماز آبی موریس (Morris water maze) تا روز هفدهام به منظور بررسی

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار مسافت طی شده فعالیت حرکتی با آزمون فضای باز گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها (n=۷)	میانگین و انحراف معیار مسافت طی شده (متر)	P-value در مقایسه با گروه کنترل	P-value در مقایسه با گروه ایسکمی
گروه کنترل (Control)	۱۵/۵۷۱۴±۰/۳۷۱۸۷۹	-	>۰/۰۵
حلال (Solvent)	۱۵/۳۰۲۸۶±۰/۹۰۲۴۴۶	>۰/۰۵	>۰/۰۵
جراحی (Solvent)	۱۵/۳۶۱۴۳±۱/۲۹۴۱۳۶	>۰/۰۵	>۰/۰۵
گروه الفا سکنه مغزی بدون دریافت دارو و حلال (Ischemia)	۱۵/۲۰۷۱۴±۱/۱۰۲۷۳۶	>۰/۰۵	>۰/۰۵
گروه الفا سکنه مغزی با تزریق روزانه حلال (Ischemia+salin)	۱۶/۲۴۷۱۴±۰/۵۱۸۳۹۸	>۰/۰۵	>۰/۰۵
گروه الفا سکنه مغزی دریافت کننده داروی مینوسایکلین با دوز ۱۱/۲۵ mg/kg/bw	۱۵/۹۲۱۴۳±۱/۴۸۳۷۳۴	>۰/۰۵	>۰/۰۵
گروه الفا سکنه مغزی دریافت کننده داروی مینوسایکلین با دوز ۲۲/۵۰ mg/kg/bw	۱۷/۱۷۱۴۳±۰/۴۸۳۵۴۱	>۰/۰۵	>۰/۰۵
گروه الفا سکنه مغزی دریافت کننده داروی مینوسایکلین با دوز ۴۵ mg/kg/bw	۱۵/۵۶۲۸۶±۰/۶۳۸۸۱۹	>۰/۰۵	>۰/۰۵

جدول ۲: میانگین و انحراف معیار مدت زمان سپری شده در میزان اضطراب آزمون فضای باز گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها (n=۷)	میانگین و انحراف معیار مدت زمان سپری شده در مرکز (ثانیه)	P-value در مقایسه با گروه کنترل	P-value در مقایسه با گروه جراحی	P-value در مقایسه با گروه ایسکمی
گروه کنترل (Control)	۲۸/۴۲۸۵۷±۱/۷۱۶۲۶۹	-	۰/۰۶۴	<۰/۰۰۱ ***
حلال (Solvent)	۲۸/۶۹۸۵۷±۰/۵۹۲۷۳۶	>۰/۹۹۹	۰/۰۴۱ *	<۰/۰۰۱ ***
جراحی (Solvent)	۲۳/۷۱۴۲۹±۱/۱۶۹۳۳۶	۰/۰۶۴	-	<۰/۰۰۱ ***
گروه الفا سکنه مغزی بدون دریافت دارو و حلال (Ischemia)	۱۲/۵۱۵۷۱±۰/۸۰۰۲۶۴	<۰/۰۰۱ ***	<۰/۰۰۱ ***	-
گروه الفا سکنه مغزی با تزریق روزانه حلال (Ischemia+salin)	۱۱/۴۹۴۲۹±۰/۷۰۹۵۲	<۰/۰۰۱ ***	<۰/۰۰۱ ***	۰/۹۹۸
گروه الفا سکنه مغزی دریافت کننده داروی مینوسایکلین با دوز ۱۱/۲۵ mg/kg/bw	۱۲/۷۱۷۱۴±۰/۹۲۶۶۹۶	<۰/۰۰۱ ***	<۰/۰۰۱ ***	>۰/۹۹۹
گروه الفا سکنه مغزی دریافت کننده داروی مینوسایکلین با دوز ۲۲/۵۰ mg/kg/bw	۱۳/۵۰۲۸۶±۰/۷۳۰۲۰۱	<۰/۰۰۱ ***	<۰/۰۰۱ ***	۰/۸۹۲
گروه الفا سکنه مغزی دریافت کننده داروی مینوسایکلین با دوز ۴۵ mg/kg/bw	۲۱/۶۴۲۸۶±۱/۴۹۹۱۶۹	۰/۰۰۱ *	۰/۸۷۵	<۰/۰۰۱ ***

آبی موریس از آزمون آنوا تکرار شونده (Repeated measure Anova) و آزمون تکمیلی Tukey استفاده شد. همچنین برای بررسی تفاوت‌های آماری در سایر گروه‌ها از آزمون واریانس یکطرفه (one way ANOVA) و به منظور بررسی سطح معنی‌داری گروه‌های مختلف نسبت به هم از آزمون تکمیلی Tukey استفاده شد. سطح معنی‌داری آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

با توجه به آزمایش‌های رفتاری، هیچگونه تفاوت آماری معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه در مجموع مسافت طی شده توسط حیوانات یافت نشد (جدول یک). در حالی که افزایش سطح اضطراب توسط جراحی و همچنین اضطراب بیشتر توسط القای سکنه مغزی مشاهده شد ($P<۰/۰۰۱$). به طوری که گروه‌های ایسکمی ($P<۰/۰۰۱$)، $۱۲/۵۱۵۷۱±۰/۸۰۰۲۶۴$ میانگین مدت زمان حضور در مرکز برحسب ثانیه) و ایسکمی + سالین ($P<۰/۰۰۱$)، $۱۱/۴۹۴۲۹±۰/۷۰۹۵۲$ میانگین مدت زمان حضور در مرکز برحسب ثانیه) به صورت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل ($۲۸/۴۲۸۵۷±۱/۷۱۶۲۶۹$ میانگین مدت زمان حضور در مرکز برحسب ثانیه) میزان زمان کمتری را در مرکز دستگاه گذراندند (جدول ۲). این درحالی است که گروه دریافت کننده دوز ۴۵ mg/kg/bw از داروی مینوسایکلین، قادر بود به شکل معنی‌داری مدت زمان بیشتری را در مرکز نسبت به گروه ایسکمی سپری کند

مدت چهار روز (روز ۹ تا ۱۲ از شروع پروتکل) و هر روز چهار آموزش برای هر حیوان به فاصله پنج دقیقه از هر آموزش انجام شد. عملکرد حیوان توسط یک دوربین به رایانه انتقال یافت و ضبط شد و به وسیله نرم افزار Any-maze به دقت رصد شد. به منظور بررسی عملکرد حافظه، پس از گذشت یک روز از اتمام فرایند یادگیری (روز پنجم تا روز سیزدهم از شروع پروتکل)، آزمون بخاطرآوری به مدت یک دقیقه انجام گردید. به این صورت که در این آزمون سکو به طور کامل برداشته شد و حیوان از ربع مخالف سکو (ربع جنوب شرقی SE) به داخل ماز رها شد و به حیوان اجازه داده شد تا مدت زمان یک دقیقه در محیط ماز شنا کند. مدت زمانی که حیوان در ربع هدف (ربعی که سکو در آن قرار گرفته بود یا NW) به عنوان معیاری برای فرایند بخاطرآوری ثبت گردید (مرحله پروب یک، Probe Trial).^{۲۰} برای بررسی فرایند یادگیری معکوس در روز ششم تا هشتم (روز چهاردهم تا شانزدهم از شروع پروتکل) سکو در ربع مقابل (ربع جنوب شرقی SE) قرار داده شد و فرایند یادگیری به مانند روزهای قبل به مدت سه روز انجام شد. همچنین در روز نهم (روز هفده و آخرین روز از شروع پروتکل) بررسی فرایند بخاطرآوری با برداشتن سکو از ربع جدید به مانند مرحله پروب یک؛ اما با تفاوت در مکان سکو صورت پذیرفت (پروب ۲).^{۲۱}

داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری GraphPad Prism 10 بررسی آماری شدند. نتایج حاصل شده به صورت میانگین و خطای استاندارد ارائه شد. به منظور مقایسه معنی‌داری بین گروه‌ها در ماز

جدول ۳: میانگین و انحراف معیار درصد انتخاب‌های صحیح در عملکرد حافظه کوتاه مدت در آزمون ماز Y گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها (n=۷)	میانگین و انحراف معیار درصد انتخاب‌های صحیح	P-value در مقایسه با گروه کنترل	P-value در مقایسه با گروه ایسکمی
گروه کنترل (Control)	۷۲/۸۲۸۵۷±۲/۹۴۷۱۶۶	-	<۰/۰۰۱ ***
حلال (Solvent)	۷۳/۴۴۸۵۷±۳/۸۴۴۲۵۵	>۰/۹۹۹	<۰/۰۰۱ ***
جراحی (Solvent)	۷۰/۱۵۷۱۴±۲/۲۲۱۲۱۲	۰/۹۹۲	<۰/۰۰۱ ***
گروه القا سکنه مغزی بدون دریافت دارو و حلال (Ischemia)	۴۹/۴۳۸۳۳±۲/۱۳۵۰۳۷	<۰/۰۰۱ ***	-
گروه القا سکنه مغزی با تزریق روزانه حلال (Ischemia+salin)	۵۰/۰۹۱۴۳±۲/۱۱۸۲۴۷	<۰/۰۰۱ ***	>۰/۹۹۹
گروه القا سکنه مغزی دریافت کننده داروی مینوسایکلین با دوز ۱۱/۲۵ mg/kg/bw	۵۱/۷۲۸۵۷±۲/۰۵۱۷۷۶	<۰/۰۰۱ ***	۰/۹۹۸
گروه القا سکنه مغزی دریافت کننده داروی مینوسایکلین با دوز ۲۲/۵۰ mg/kg/bw	۶۳/۵۷۱۴۳±۰/۷۸۲۴۶۱	۰/۱۲۱	<۰/۰۰۳ **
گروه القا سکنه مغزی دریافت کننده داروی مینوسایکلین با دوز ۴۵ mg/kg/bw	۶۷/۳۵۷۱۴±۱/۲۹۴۲۸۳	۰/۷۱۸	<۰/۰۰۱ ***

(P<۰/۰۰۱).

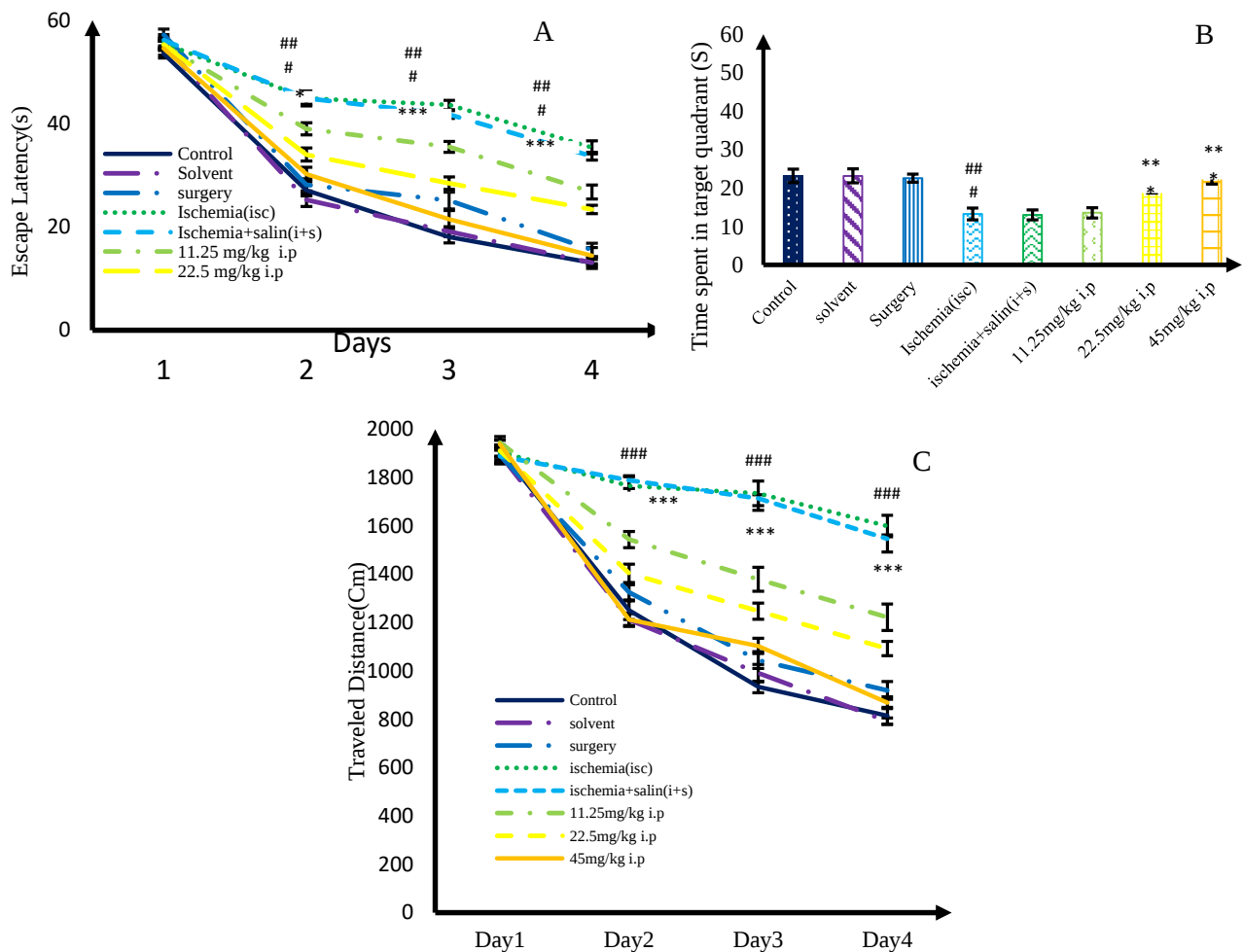
دوم، سوم و چهارم به ترتیب برابر با $30/1793 \pm 1/36626$ ، $21/45 \pm 1/70925$ و $22/5 \text{ mg/kg/bw}$ مینوسایکلین برای روزهای دوم، سوم و چهارم به ترتیب با مقادیر $34/7745 \pm 10/80808$ ، $23/375 \pm 0/83263$ و $29/1121 \pm 0/85083$ ثانیه تعیین گردید. مدت زمان میانگین کشف سکو در دوز $11/25 \text{ mg/kg/bw}$ مینوسایکلین در روزهای دوم، سوم و چهارم به ترتیب برابر مقادیر $35/4829 \pm 10/5502$ ، $38/9789 \pm 1/19255$ و $26/7525 \pm 1/3714$ ثانیه تعیین گردید. ایسکمی / رپرفیوژن در موش‌های آسیب دیده منجر به کاهش قابل توجهی در زمان شنا برای رسیدن به سکوی پنهان در مقایسه با گروه ایسکمی 45 mg/kg/bw گردید ($P<۰/۰۰۱$). روز نهم تا دوازدهم از شروع فرایند برابر با روز اول تا چهارم از شروع تست ماز آبی موریس است (شکل ۱-A).

در آزمون پروب، آسیب ناشی از فرایند ایسکمی / رپرفیوژن (میانگین مدت زمان حضور در ربع هدف در گروه ایسکمی $15/2857 \pm 10/6266$ ثانیه) منجر به کاهش مدت زمان گذرانیده شده در ربع هدف (شمال غربی یا NW) نسبت به گروه کنترل (میانگین مدت زمان حضور در ربع هدف در گروه کنترل $27/2857 \pm 0/56544$ ثانیه) گردید ($P<۰/۰۰۱$) (شکل ۱-B). در حالی که میانگین مدت زمان حضور در ربع هدف در گروه تجویز شده مینوسایکلین در دوزهای 45 mg/kg/bw ($1/68628 \pm 22/7143$ ثانیه) منجر به افزایش معنی‌دار زمان حضور گردید ($P<۰/۰۰۱$) (شکل ۱-B).

در ادامه آزمون پروب و مرحله یادگیری معکوس، میانگین مدت زمان صرف شده برای پیدا کردن سکو در گروه ایسکمی در روزهای ششم، هفتم و هشتم به ترتیب برابر با $40/4314 \pm 0/6919$ ، $25/5396 \pm 0/94068$ و $33/9514 \pm 1/00633$ ثانیه تعیین شد. این میزان در گروه ایسکمی + سالین در روزهای ششم، هفتم و هشتم برابر با $39/4554 \pm 1/2347$ ، $34/4075 \pm 0/90847$ و $26/3921 \pm 0/90908$ ثانیه تعیین گردید که به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل در روزهای ششم، هفتم و هشتم به ترتیب با مقادیر

یافته‌های حاصل از آزمون Y-maze نشان داد که القای سکنه مغزی سراسری ($48/43833 \pm 2/135037$) میانگین درصد تناوب در گروه ایسکمی می‌تواند به صورت معنی‌داری موجب کاهش پاسخ‌های صحیح نسبت به گروه کنترل ($72/82857 \pm 2/947166$) میانگین درصد تناوب در گروه کنترل شود ($P<۰/۰۰۱$) (جدول ۳). این در حالی است که درمان با مینوسایکلین در دوز $22/50 \text{ mg/kg/bw}$ ($0/782461 \pm 63/57143$) میانگین درصد تناوب و دوز 45 mg/kg/bw ($1/294282 \pm 67/35714$) درصد تناوب به صورت معنی‌داری موجب افزایش انتخاب‌های صحیح در حیوان گردید ($P<۰/۰۰۵$) (جدول ۳).

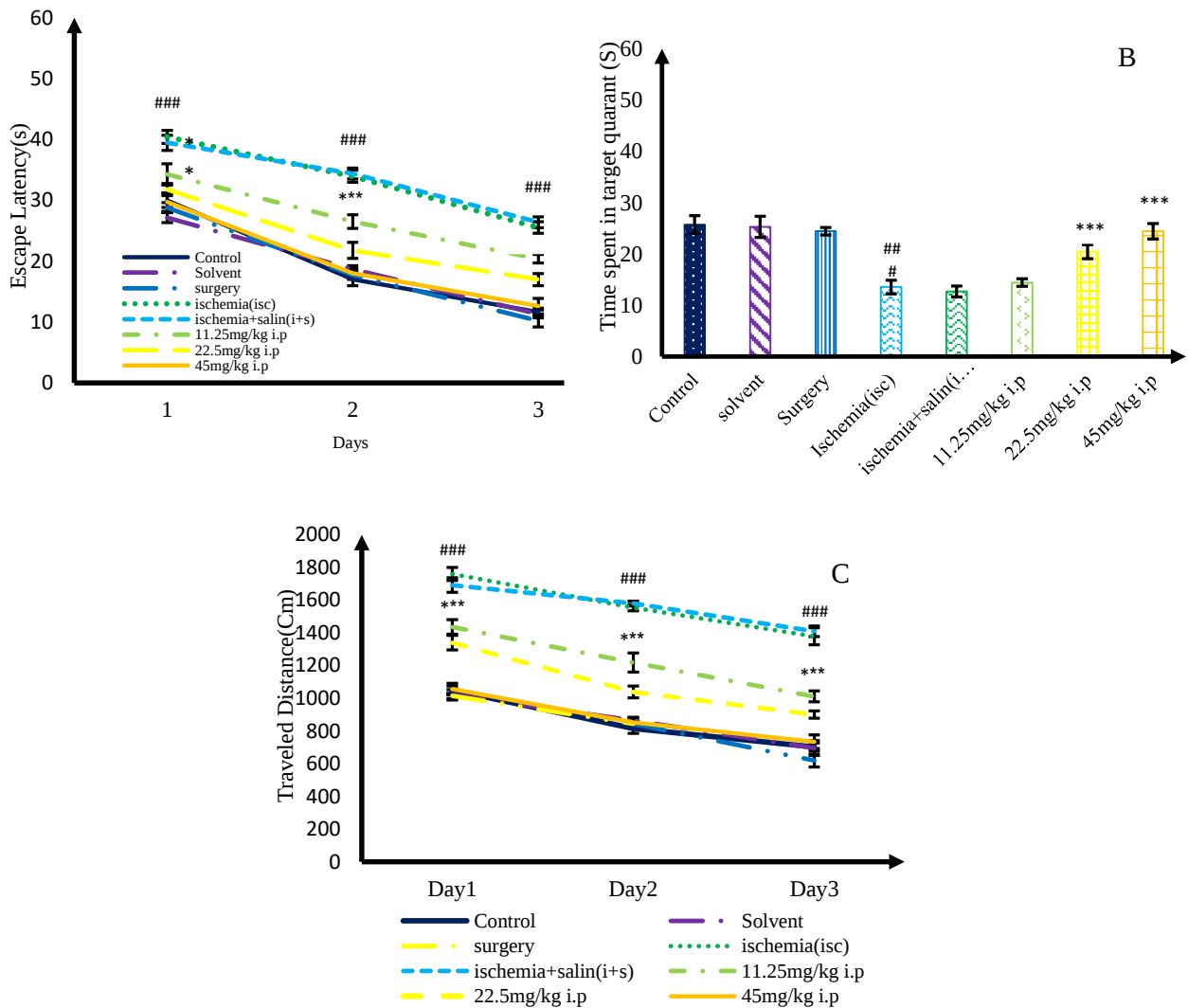
در همه گروه‌ها پس از انجام آزمون ماز آبی موریس، با گذشت زمان طی چهار روز اول آزمون (از روز نهم تا روز دوازدهم) مدت زمان رسیدن به سکو به تدریج نسبت به روز اول کاهش یافت ($P<۰/۰۰۱$)، شکل ۱-A). این در حالی است که زمان شنا به منظور پیدا کردن سکو پنهان شده در گروه‌های ایسکمی روز دوم مدت زمان میانگین کشف سکو برابر با $44/8546 \pm 1/42801$ ثانیه، روز سوم مدت زمان میانگین کشف سکو برابر $43/5939 \pm 0/91255$ ثانیه و نهایتاً روز چهارم مدت زمان میانگین کشف سکو برابر با $35/3779 \pm 1/26589$ ثانیه و ایسکمی+سالین روز دوم مدت زمان میانگین کشف سکو برابر با $44/8529 \pm 1/09109$ ثانیه، روز سوم مدت زمان میانگین کشف سکو برابر $41/7511 \pm 0/73873$ ثانیه و نهایتاً روز چهارم مدت زمان میانگین کشف سکو برابر با $33/6557 \pm 0/76452$ ثانیه نسبت به گروه کنترل روز دوم مدت زمان میانگین کشف سکو برابر با $27/0875 \pm 1/09509$ ثانیه، روز سوم مدت زمان میانگین کشف سکو برابر $18/0054 \pm 1/09125$ ثانیه و نهایتاً روز چهارم مدت زمان میانگین کشف سکو برابر با $13/0586 \pm 1/14168$ ثانیه در روزهای دهم تا دوازدهم یعنی روز دوم تا چهارم از شروع آزمون، به صورت معنی‌داری بیشتر بود ($P<۰/۰۰۱$)، شکل ۱-A). این در حالی است که مدت زمان میانگین کشف سکو در تجویز مینوسایکلین در دوز 45 mg/kg/bw روزهای



شکل ۱: نتایج آزمون ماز آبی موریس (بررسی فرایند یادگیری فضایی در مرحله ابتدایی در روزهای نه تا دوازده یا یک تا چهار از شروع آزمون).
 (A) القای ایسکمی سراسری مغزی منجر به ایراد در حافظه بلند مدت فضایی گردید (### $p<0.001$ ischemia vs control group) درحالی که تجویز درون صفاقی مینوسایکلین در تمام دوزها آن را بهبود بخشید. در اینجا به منظور جلوگیری از شلوغی شکل معنی داری فقط برای کمترین دوز نشان داده شده است. بنابراین دوزهای بالاتر اثر قابل توجهی داشتند.
 Day1 $P=>.999$ ns / Day2* $P=0.014$, $P<0.05$ / Day3*** $P<0.001$ / Day4, $P<0.001$ / vs ischemic group
 (B) ارزیابی فرایند به خاطر آوری (prob test) در فاز ابتدایی در روز سیزدهم یا روز پنجم آزمون. القای ایسکمی سراسری مغزی منجر به ایراد در فرایند به خاطر آوری گردید.
 ### $P<0.001$ ischemia vs control group
 تجویز مینوسایکلین منجر به بهبود اختلال ناشی شده از القای ایسکمی سراسری مغزی شد.
 *** $P<0.001$, 22.50mg/kg i.p. / *** $P<0.001$, 45mg/kg i.p. / vs ischemic group
 (C) ارزیابی میزان کل مسافت طی شده در فاز ابتدایی در روزهای نه تا دوازده یا یک تا چهار از شروع آزمون. القای ایسکمی سراسری مغزی منجر به اختلال در فرایند یادگیری شد؛ اما ضربه ای به توانایی حرکتی حیوان نزد. در نتیجه در حیوانات ایسکمی/ رپرفیوژن مسافت بیشتری طی شد که دلیل آن اختلال در حافظه برای پیدا نمودن سکو بود.
 ### $P<0.001$ ischemia vs control group
 تجویز مینوسایکلین منجر به بهبود اختلال در یادگیری ناشی شده از القای ایسکمی سراسری مغزی گردید و در نتیجه مسافت کمتری طی شد
 *** $P<0.01$ vs ischemic group
 در این نمودار دوزهای بالادست حذف شده است.
 داده ها توسط آزمون ANOVA یکطرفه (one-way) در نمودار B و تکرار شونده (repeated major) در نمودار C و A و پس از آزمون Tukey تجزیه و تحلیل شدند (n=7).

در دوز ۱۱/۲۵ mg/kg/bw (روز ششم ۳۵/۰۰۶۴±۰/۵۲۳۵۴، روز هفتم ۲۵/۲۸۶۸±۰/۴۹۱۵۱، روز هشتم ۲۰/۳۸۷۱±۰/۶۹۴۹۹، روز نهم ۲۵/۲۸۶۸±۰/۴۹۱۵۱، روز دهم ۲۰/۳۸۷۱±۰/۶۹۴۹۹) منجر به کاهش قابل توجهی در زمان شنا برای رسیدن به سکوی پنهان در مقایسه با گروه ایسکمیک گردید (P<۰/۰۰۱) (شکل ۲-A). در ادامه و در روز نهم از شروع آزمون ماز آبی موریس یا روز هفدهم از شروع پروتکل آزمون پروب معکوس یا پروب ۲ انجام گرفت. آسیب ناشی از فرایند ایسکمی / رپرفیوژن (میانگین مدت زمان حضور در ربع هدف در گروه ایسکمی ۱۶/۲۸۵۷±۰/۵۲۱۶۴، روز ششم ۳۵/۰۰۶۴±۰/۵۲۳۵۴، روز هفتم ۲۵/۲۸۶۸±۰/۴۹۱۵۱، روز هشتم ۲۰/۳۸۷۱±۰/۶۹۴۹۹، روز نهم ۲۵/۲۸۶۸±۰/۴۹۱۵۱، روز دهم ۲۰/۳۸۷۱±۰/۶۹۴۹۹) منجر به کاهش مدت زمان

۲۹/۹۸۰±۰/۱۶۰۵۳، روز ششم ۲۹/۷۲۵±۰/۵۲۱۳۵، روز هفتم ۲۵/۲۸۶۸±۰/۴۹۱۵۱، روز هشتم ۲۰/۳۸۷۱±۰/۶۹۴۹۹، روز نهم ۲۵/۲۸۶۸±۰/۴۹۱۵۱، روز دهم ۲۰/۳۸۷۱±۰/۶۹۴۹۹) تعیین شد (P<۰/۰۰۱) (شکل ۲-B). در مرحله یادگیری معکوس از آزمون پروب، میانگین مدت زمان صرف شده برای پیدا کردن سکو در گروه دریافت کننده مینوسایکلین در دوز ۴۵mg/kg/bw (روز ششم ۲۹/۷۲۵±۰/۵۲۱۳۵، روز هفتم ۲۵/۲۸۶۸±۰/۴۹۱۵۱، روز هشتم ۲۰/۳۸۷۱±۰/۶۹۴۹۹، روز نهم ۲۵/۲۸۶۸±۰/۴۹۱۵۱، روز دهم ۲۰/۳۸۷۱±۰/۶۹۴۹۹) و در گروه دریافت کننده مینوسایکلین در دوز ۲۲/۵ mg/kg/bw (روز ششم ۳۲/۵۹۶۴±۰/۴۹۹۵۱، روز هفتم ۲۹/۷۲۵±۰/۵۲۱۳۵، روز هشتم ۲۰/۳۸۷۱±۰/۶۹۴۹۹، روز نهم ۲۵/۲۸۶۸±۰/۴۹۱۵۱، روز دهم ۲۰/۳۸۷۱±۰/۶۹۴۹۹) و در گروه دریافت کننده مینوسایکلین



شکل ۲: نتایج آزمون ماز آبی موریس (فاز معکوس)
 (A) ارزیابی فرایند یادگیری معکوس یا تغییر استراتژی در روزهای چهارده تا شانزدهم یا شش تا هشت از شروع آزمون. القای ایسکمی سراسری مغزی منجر به ایراد در حافظه بلند مدت فضایی شد (ischemia vs control group $P < 0.001$ ###).
 تجویز درون صفاقی مینوسایکلین در تمام دوزها آنرا بهبود بخشید. به منظور جلوگیری از شلوغی شکل معنی‌داری فقط برای کمترین دوز نشان داده شده است؛ بنابراین دوزهای بالاتر اثر قابل توجهی دارند (Day 1 $P = 0.001$, $P < 0.01^{**}$ / Day 2 $P < 0.001^{***}$ / Day 3 $P = 0.013$, $P < 0.05^{*}$ vs ischemic group).
 (B) ارزیابی فرایند بخاطرآوری (prob test) در فاز معکوس در روز هفدهم یا روز نهم آزمون. القای ایسکمی سراسری مغزی منجر به ایراد در فرایند بخاطرآوری شد. (ischemia vs control group $P < 0.001$ ###).
 تجویز مینوسایکلین منجر به بهبود اختلال ناشی شده از القای ایسکمی سرتاسری مغزی شد (22.50mg/kg i.p) / (45mg/kg i.p) vs ischemic group $P < 0.001^{***}$ / $P < 0.001^{***}$).
 (C) ارزیابی میزان کل مسافت طی شده در فاز معکوس در روزهای چهارده تا شانزدهم یا شش تا هشت از شروع آزمون. القای ایسکمی سراسری مغزی منجر به اختلال در فرایند یادگیری شد؛ اما ضربه‌ای به توانایی حرکتی حیوان نزد. در نتیجه در حیوانات ایسکمی / رپرفیوژن مسافت بیشتری طی شد که دلیل آن اختلال در حافظه برای پیدا نمودن سکو است (ischemia vs control group $P < 0.001$ ###).
 تجویز مینوسایکلین منجر به بهبود اختلال در یادگیری ناشی شده از القای ایسکمی سرتاسری مغزی شد؛ در نتیجه مسافت کمتری طی شد (ischemic group vs $P < 0.001^{***}$).
 در این نمودار نیز دوزهای بالادست حذف شده است.
 داده‌ها توسط آزمون ANOVA یکطرفه (one-way) در نمودار B و تکرار شونده (repeated major) در نمودارهای A و C و پسا آزمون Tukey تجزیه و تحلیل شدند (n=7).

ثانیه) منجر به افزایش معنی‌دار زمان حضور گردید ($P < 0.001$) (شکل ۲-B).

از مقایسه روز اول در شکل ۲-C و شکل ۲-C مربوط به عدم معنی‌داری میزان مسافت طی شده در روز اول، مشاهده شد که فعالیت‌های حرکتی دستخوش تغییر نشدند.

گذرانیده شده در ربع هدف (جنوب غربی یا SW) نسبت به گروه کنترل ($30/7143 \pm 0/91844$ ثانیه) گردید ($P < 0.001$) (شکل ۲-B) و آسیب در عملکرد حافظه فضایی همراه با تغییر استراتژی یادگیری و فرایند به‌خاطرآوری مشاهده شد. در حالی که میانگین مدت زمان حضور در ربع هدف در گروه ایسکمی دریافت‌کننده مینوسایکلین در دوز ۴۵mg/kg/bw ($26/8571 \pm 0/91101$ ثانیه)، گروه دریافت‌کننده مینوسایکلین در دوز ۲۲/۵ mg/kg/bw ($24/1429 \pm 0/50843$)

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه تجویز مینوسایکلین توانست سبب بهبود عملکرد شناختی، حافظه و اضطراب بدون ایجاد اختلال در فعالیت‌های حرکتی پس از ایسکمی مغزی به‌ویژه در دوزهای ۲۲/۵ و ۴۵ میلی گرم بر کیلوگرم شود. احتمالاً دلیل بهبودی در دوزهای مذکور به خاطر توانایی‌های دارو در اعمال محافظت عصبی و جلوگیری از مرگ سلولی است که این اثرات از دوز ۲۲/۵ و ۴۵ میلی گرم بر کیلوگرم دیده شد و دوز ۱۱/۲۵ کمتر از آن بود که توان نشان دادن اثرات را داشته باشد. به عبارتی پاسخ بهبودی دهنده دارو، یک اثر وابسته به دوز نشان داده است.

با توجه به نتایج آزمون فضای باز و میزان مسافت پیمایش شده بین گروه‌های مختلف تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد که این امر احتمالاً بیانگر عدم تاثیر ایسکمی/ریپرفیوژن بر فعالیت‌های گروه‌های مورد مطالعه حاضر، موافق با سایر مطالعات مشابه^{۲۲} نیز به اثبات رسیده است. همچنین از مقایسه روز اول در میزان مسافت طی شده به علت عدم معنی‌داری داده‌ها در روز اول مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که فعالیت‌های حرکتی دستخوش تغییر نشده‌اند که نشان می‌دهد میزان مسافت طی شده در روز اول که هیچ کدام از حیوانات شناختی و یادگیری نسبت به محیط آزمون نداشتند؛ بدون اختلاف معنی‌دار بوده و نمایان می‌کند که حیوانات همه گروه‌ها مسافت تقریبی برابری را پیموده‌اند و فعالیت‌های حرکتی دستخوش تغییر نشده‌اند که از دلایل آن می‌توان ابراز نمود که مغز موش‌های صحرایی قابلیت بالایی در فعالسازی مسیرهای جایگزین (Alternative Pathways) و انعطاف‌پذیری سیناپسی (Synaptic Plasticity) داشته و پس از آسیب ایسکمیک، نورون‌های سالم باقی‌مانده ممکن است؛ عملکرد نواحی آسیب‌دیده را تا حدی جبران نموده باشند.^{۲۳} همچنین حجم کوچک‌تر ناحیه آسیب‌دیده در مدل موش‌های صحرایی آسیب دیده اغلب محدود به قشر حرکتی اولیه است. در حالی که نواحی مسئول هماهنگی پیچیده‌تر حرکتی مثل مخچه یا گانگلیون‌های پایه، کمتر درگیر می‌شوند.^{۲۴}

مدت زمان حضور در ناحیه مرکزی به عنوان نشانه‌ای از میزان استرس حیوان تلقی می‌شود.^{۲۵،۲۶} بر این اساس کاهش معنی‌دار مدت زمان حضور در مرکز فضای آزمون نشان‌دهنده افزایش میزان اضطراب توسط حیوان است که در مطالعه حاضر با مقایسه حیوانات گروه‌های ایسکمی و ایسکمی+سالین با حیوانات گروه کنترل مشخص می‌گردد. آزمون فضای باز نشان داد که پس از درمان مینوسایکلین، مقدار زمانی که در منطقه مرکزی منطقه صرف می‌شود؛ نشان‌دهنده کاهش رفتارهای اضطراب است. در حالی که برخی مطالعات هیچ تغییری در میزان زمان صرف شده در منطقه

مرکزی در طول یک آزمون فضای باز نشان ندادند و دیگران بیان نمودند که ایسکمی/ریپرفیوژن منجر به افزایش اضطراب می‌شود.^{۲۷،۲۸} احتمالاً پس از بروز ایسکمی، جمعیت سلول‌های میکروگلیا CD68 افزایش می‌یابد.^{۲۹} این افزایش در برخی از قسمت‌ها مانند ژيروس دندانی (DG) هیپوکامپ رخ می‌دهد.^{۳۰} این افزایش منجر به استرس می‌شود؛ مینوسایکلین با کاهش جمعیت سلول‌های میکروگلیا (CD68) در DG احتمالاً منجر به کاهش میزان استرس می‌شود^{۳۰} که در مطالعه حاضر در طول آزمون فضای باز مشاهده شد.

با توجه به نتایج آزمون ماز Y القا ایسکمی/ریپرفیوژن در مدل‌های حیوانی منجر به کاهش درصد صحیح تناوب‌های خودبه‌خودی در گروه‌های ایسکمی و ایسکمی+ریپرفیوژن نسبت به گروه کنترل گردید که احتمالاً به معنی آسیب به حافظه کوتاه مدت حیوانات این گروه است. در حالی که تجویز درون صفاقی مینوسایکلین احتمالاً به صورت وابسته به دوز منجر به بهبود عملکرد حافظه کوتاه مدت گردیده که از افزایش درصد تناوب‌های صحیح در گروه‌های درمان قابل استنباط است. اثرات مفید مینوسایکلین شامل مکانیسم‌های مختلف از جمله اثرات ضدالتهابی،^{۳۱} اثرات ضدآپوپتوتیک،^{۳۲،۳۳} مهار متالوپروتئیناز^{۳۴} و خواص پاکسازی رادیکال‌های آزاد^{۳۵} است. در مطالعات قبلی نشان داده شد که ایسکمی/ریپرفیوژن با مکانیسم‌های ذکر شد منجر به تحت تاثیر قرارگیری نقاط مختلف مغز مانند نئوکورتکس، استریاتوم و هیپوکامپ در زمان‌های مشخصی تحت تاثیر عوارض ایسکمی قرار می‌گیرند.^{۳۶} معمولاً نورون‌های CA1 هیپوکامپ بسیار حساس بوده و اگر میزان کاهش جریان CSF حدود سه الی پنج دقیقه طول بکشد؛ می‌تواند منجر به آسیب در این ناحیه گردد در حالی که نورون‌های ناحیه استریاتوم مقاوم‌تر بوده و مدت زمان کاهش جریان مغزی برای آسیب آنها حدود ۱۵ الی ۲۰ دقیقه است. پس از ریپرفیوژن و برقراری مجدد جریان خون و CSF میزان آسیب ثانویه و مدت زمان لازم برای بروز آسیب متفاوت است. مثلاً آسیب در سلول‌های متوسط استریاتوم حدود سه ساعت بعد از ریپرفیوژن و آسیب در سلول‌های CA1 هیپوکامپ حدود ۲۴ الی ۴۸ ساعت بعد با پدیده‌ای به نام مرگ عصبی با تاخیر مشخص می‌شود.^{۳۷} آسیب به نواحی مختلف در اثر ایسکمی گلوبال به علت فرایندهای نظیر التهاب، استرس اکسیداتیو، سمیت تحریکی که نهایتاً منجر به نکروز و آپوپتوز می‌شوند؛ منجر به آسیب نواحی مختلف مغز می‌شوند که نتیجه آن بروز اختلالات مختلف است. به علت آسیب (التهاب، استرس اکسیداتیو، سمیت تحریکی، آپتوز و نکروز) به ناحیه CA1 پس از ایسکمی،^{۲۲} تجویز مینوسایکلین در مطالعه حاضر احتمالاً به علت خاصیت‌های محافظتی ذکر شده، منجر به بهبود عملکرد حافظه کوتاه مدت گردید.

در مطالعه حاضر ایسکمی / ریپرفیوژن منجر به اختلال در حافظه و

نشان داده شده که ایسکمی مغزی منجر به آسیب گذرا به فرایند یادگیری می‌شود. این در حالی است که آسیب ناشی از ایسکمی بر روی حافظه پایدارتر است.^{۴۳} از آنجایی که قسمت بیشتر حافظه مرتبط با نورون‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ است؛ با توجه به فرایند مرگ تاخیری نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ در روزهای بعد از ایسکمی/رپرفیوژن احتمالاً اختلالات مربوط به حافظه تداوم بیشتری خواهند داشت.^{۴۴} آزمون پروب و ارزیابی حافظه در روزهای پنجم و نهم از آزمون ماز آبی موریس در مطالعه حاضر نشان داد که ایسکمی منجر به اختلال در حافظه شده و حیوانات گروه‌های ایسکمی و ایسکمی+سالین نسبت به حیوانات گروه کنترل، مدت زمان کمری را در ربع هدف سپری کردند؛ اما تجویز مینوسایکلین به صورت داخل صفاقی در گروه‌های درمانی، احتمالاً منجر به افزایش نرخ زنده‌مانی سلول‌های ناحیه مربوطه و منجر به بهبود حافظه در پی اختلال ایسکمی شد. مطالعات نشان داده که فرایند ایسکمی/رپرفیوژن سرتاسری مغزی با افزایش مرگ نورون‌ها در هیپوکامپ منجر به اختلال در حافظه کوتاه‌مدت نیز می‌شود.^{۴۵،۴۶}

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که مینوسایکلین، به‌ویژه در دوزهای ۲۲/۵ و ۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌تواند عملکرد شناختی، حافظه و اضطراب را بدون ایجاد اختلال در فعالیت‌های حرکتی پس از ایسکمی مغزی بهبود بخشد.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه فردوسی مشهد (IR.UM.REC.1401.265) قرار گرفت.

چکیده این مقاله به صورت مختصر (عدم ذکر نتایج ماز آبی موریس) در دوازدهمین کنفرانس علوم اعصاب پایه و بالین به صورت پوستر، ارائه شده است.

حمایت مالی

این مقاله حاصل پایان‌نامه (شماره گرنت ۳/۵۹۵۲۴) آقای محمد خواجه نوری برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست‌شناسی گرایش فیزیولوژی جانوری از دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد بود.

مشارکت نویسندگان

محمد خواجه نوری: انجام پروژه، جمع‌آوری داده‌ها، آنالیز داده‌ها، تفسیر نتایج و نوشتن نسخه اولیه مقاله.

دکتر مسعود فریدونی: مدیریت و طراحی پروژه، انجام پروژه، جمع‌آوری داده‌ها، آنالیز داده‌ها، تفسیر نتایج و تایید نسخه نهایی مقاله.

تعارض منافع

بین نویسندگان تضاد منافع وجود ندارد.

کاهش در فرایند یادگیری در روزهای یک تا چهار ماز آبی موریس گردید که این امر از مقایسه مدت زمان یافتن سکو در گروه‌های ایسکمی و ایسکمی+سالین بارز است. نورون‌های هیپوکامپ نقش بسیار مهمی در فرایند یادگیری و حافظه فضایی بازی می‌کند. در نتیجه آسیب به این نورون‌ها به علت القای ایسکمی سرتاسری (مسدودسازی شریان‌های کاروتید به مدت ۲۰ دقیقه) منجر به بروز اختلالات حافظه و یادگیری شده^{۳۸} و مدت زمان سپری شده برای پیدا کردن سکو در گروه‌های ایسکمی و ایسکمی+سالین مطالعه حاضر نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد. در صورتی که مدت زمان سپری شده در گروه‌های دریافت‌کننده تجویز درون صفاقی مینوسایکلین نسبت به گروه ایسکمی بسیار کمتر شده بود و آنها را قابل مقایسه با گروه کنترل کرد که علت این امر احتمالاً به دلیل اثرات محافظتی مینوسایکلین در حفظ سلول‌های عصبی مستقر در هیپوکامپ بوده است و پنجره زمانی اتمام آسیب در هیپوکامپ در حدود سه روز پس از بروز ایسکمی است.^{۳۷} به علت شروع درمان به‌وسیله مینوسایکلین در زمان مناسب در این مطالعه، آسیب به حافظه و یادگیری در چهار روز اول ماز آبی موریس به حداقل خود رسید. نوع دیگری از یادگیری فضایی، یادگیری فضایی معکوس است.^{۳۸} به جهت بررسی این یادگیری که برخلاف یادگیری عادی که فقط طی آن LTP رخ می‌دهد؛ این یادگیری در ابتدا نیازمند LTD به جهت پاک شدن اطلاعات جدید و سپس LTP جدید برای یادگیری جدید است.^{۳۹} قطعاً هر نوع آسیب به هیپوکامپ منجر به نقص در فرایند یادگیری فضایی معکوس می‌شود.^{۲۱} در این مطالعه نیز آسیب به هیپوکامپ به دنبال ایسکمی گلوبال منجر به افزایش مدت زمان رسیدن به سکو در گروه‌های ایسکمی و ایسکمی+سالین نسبت به گروه کنترل شد. در حالی که مینوسایکلین با مکانیسم‌های محافظتی خود احتمالاً منجر به کاهش آسیب به هیپوکامپ و در نتیجه عملکرد بهتر حیوانات در طی روزهای ششم تا هشتم ماز آبی موریس شد. یادگیری مکان‌های جدید یکی از استراتژی‌های جهت‌یابی بوده که وابسته به هیپوکامپ است. استراتژی‌های مکان‌یابی بایستی انعطاف‌پذیر بوده تا بتوانند اجازه تغییرات محیطی را به حیوان بدهند. نماد این انعطاف‌پذیری فضایی به‌وسیله یادگیری معکوس و تغییر استراتژی قابل سنجش است. پایه یادگیری معکوس برپایه همان استراتژی جهت‌یابی اولیه است. نورون‌های مکانی (Place Cells) مستقر در هیپوکامپ نقش مهمی در یادگیری فضایی اولیه دارند؛ اما در تغییر استراتژی و یادگیری معکوس علاوه بر نورون‌های مکانی، بخش‌هایی از قشر اربیتورفرونتال، قشر مدیال-پری‌فرونتال، ژيروس فرونتال تحتانی، ناحیه پشتی-جانبی قشر پری‌فرونتال راست، آمیگدال و استریاتوم با رهایش ناقلین عصبی مانند دوپامین، گلوتامات و سروتونین نقش خود را ایفا می‌کنند.^{۴۰-۴۲} براساس مطالعات قبلی

خشنودی) گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد، تشکر به عمل می‌آید.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از دانشگاه فردوسی مشهد به خاطر تامین هزینه انجام مطالعه تشکر می‌نماییم. همچنین از کارکنان آزمایشگاه آموزشی تحقیقاتی فیزیولوژی جانوری (به‌خصوص سرکار خانم‌ها حق‌پیما و

References

- Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2016 Jan;133(4):e38-360. <https://doi.org/10.1161/cir.0000000000000350>.
- Tuo QZ, Zhang ST, Lei P. Mechanisms of neuronal cell death in ischemic stroke and their therapeutic implications. *Med Res Rev*. 2022 Jan;42(1):259-305. <https://doi.org/10.1002/med.21817>.
- Dvorianchikova G, Lypka KR, Adis EV, Ivanov D. Multiple types of programmed necrosis such as necroptosis, pyroptosis, oxytosis/ferroptosis, and parthanatos contribute simultaneously to retinal damage after ischemia-reperfusion. *Sci Rep*. 2022 Oct;12(1):17152. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22140-0>.
- Shaik NF, Regan RF, Naik UP. Platelets as drivers of ischemia/reperfusion injury after stroke. *Blood Adv*. 2021 Mar;5(5):1576-84. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002888>.
- Liu Y, Wang Q, Hou Z, Gao Y, Li P. Electroacupuncture Inhibits Ferroptosis by Modulating Iron Metabolism and Oxidative Stress to Alleviate Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. *J Mol Neurosci*. 2025 May;75(2):63. <https://doi.org/10.1007/s12031-025-02355-2>.
- Zhou K, Li CL, Zhang H, Suo BJ, Zhang YX, Ren XL, et al. Minocycline in the eradication of *Helicobacter pylori* infection: A systematic review and meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2024 May;30(17):2354-68. <https://doi.org/10.3748/wjg.v30.i17.2354>.
- Colovic M, Caccia S. Liquid chromatographic determination of minocycline in brain-to-plasma distribution studies in the rat. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2003 Jul;791(1-2):337-43. [https://doi.org/10.1016/s1570-0232\(03\)00247-2](https://doi.org/10.1016/s1570-0232(03)00247-2).
- Panizzutti B, Skvarc D, Lin S, Croce S, Meehan A, Bortolasci CC, et al. Minocycline as Treatment for Psychiatric and Neurological Conditions: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci*. 2023 Mar;24(6):5250. <https://doi.org/10.3390/ijms24065250>.
- Bacigaluppi M, Comi G, Hermann DM. Animal models of ischemic stroke. Part two: modeling cerebral ischemia. *Open Neurol J*. 2010 Jun;4:34-8. <https://doi.org/10.2174/1874205x01004020034>.
- Heeba GH, El-Hanafi AA. Nebivolol regulates eNOS and iNOS expressions and alleviates oxidative stress in cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Life Sci*. 2012 Mar;90(11-12):388-95. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.12.001>.
- Altinay S, Cabalar M, Isler C, Yildirim F, Celik DS, Zengi O, et al. Is Chronic Curcumin Supplementation Neuroprotective Against Ischemia for Antioxidant Activity, Neurological Deficit, or Neuronal Apoptosis in an Experimental Stroke Model? *Turk Neurosurg*. 2017;27(4):537-45. <https://doi.org/10.5137/1019-5149.jtn.17405-16.0>.
- Sharifi ZN, Abolhassani F, Hassanzadeh G, Zarrindast MR, Movassaghi S. Neuroprotective Treatment With FK506 Reduces Hippocampal Damage and Prevents Learning and Memory Deficits After Transient Global Ischemia in Rat. *Arch Neurosci*. 2014;1(1):35-40. <https://doi.org/10.5812/archneurosci.9163>.
- Cipolla MJ. *The Cerebral Circulation*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences. 2009.
- Dimagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*. 1999 Sep;22(9):391-97. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(99\)01401-0](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(99)01401-0).
- Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res*. 1982 May;239(1):57-69. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)90833-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90833-2).
- Walsh RN, Cummins RA. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull*. 1976 May;83(3):482-504.
- Mujawar S, Patil J, Chaudhari B, Saldanha D. Memory: Neurobiological mechanisms and assessment. *Ind Psychiatry J*. 2021 Oct;30(Suppl 1):S311-S314. <https://doi.org/10.4103/0972-6748.328839>.
- Onalapo OJ, Onalapo AY. Elevated Plus Maze and Y-Maze Behavioral Effects of Subchronic, Oral Low Dose Monosodium Glutamate in Swiss Albino Mice. *IOSR-JPBS*. 2012;3(4):21-27. <https://doi.org/10.9790/3008-0342127>.
- Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 1984 May;11(1):47-60. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0165-0270(84)90007-4).
- Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc*. 2006;1(2):848-58. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.116>.
- Walsh CM, Booth V, Poe GR. Spatial and reversal learning in the Morris water maze are largely resistant to six hours of REM sleep deprivation following training. *Learn Mem*. 2011 Jun;18(7):422-34. <https://doi.org/10.1101/lm.2099011>.
- Farhadi Moghadam B, Fereidoni M. Neuroprotective effect of menaquinone-4 (MK-4) on transient global cerebral ischemia/reperfusion injury in rat. *PLoS One*. 2020 Mar;15(3):e0229769. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229769>.
- Murphy TH, Corbett D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci*. 2009 Dec;10(12):861-72. <https://doi.org/10.1038/nrn2735>.
- Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav*. 2007 May;87(1):179-97. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2007.04.015>.
- Llinas R, Barbut D, Caplan LR. Neurologic complications of cardiac surgery. *Prog Cardiovasc Dis*. 2000 Sep-Oct;43(2):101-12. <https://doi.org/10.1053/pcad.2000.9030>.
- Fu L, Guan LN. Long period changes of hippocampal cerebral blood flow and its correlation with anxiety-like behavior and inflammation after incomplete cerebral ischemia reperfusion in rats. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2023;84(4):425-34. <https://doi.org/10.3233/ch-231770>.
- Sommer B, Seeburg PH. Glutamate receptor channels: novel properties and new clones. *Trends Pharmacol Sci*. 1992 Jul;13(7):291-96. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(92\)90088-n](https://doi.org/10.1016/0165-6147(92)90088-n).

28. Choi DW. Methods for antagonizing glutamate neurotoxicity. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1990;2(2):105-47.
29. Graham SH, Chen J. Programmed cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001 Feb;21(2):99-109. <https://doi.org/10.1097/00004647-200102000-00001>.
30. Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, et al. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron.* 1995 Oct;15(4):961-73. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90186-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90186-8).
31. Bastos LF, Merlo LA, Rocha LT, Coelho MM. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of doxycycline and minocycline in different experimental models. *Eur J Pharmacol.* 2007 Dec;576(1-3):171-79. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.07.049>.
32. Scarabelli TM, Stephanou A, Pasini E, Gitti G, Townsend P, Lawrence K, et al. Minocycline inhibits caspase activation and reactivation, increases the ratio of XIAP to smac/DIABLO, and reduces the mitochondrial leakage of cytochrome C and smac/DIABLO. *J Am Coll Cardiol.* 2004 Mar;43(5):865-74. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2003.09.050>.
33. Jordan J, Fernandez-Gomez FJ, Ramos M, Ikuta I, Aguirre N, Galindo MF. Minocycline and cytoprotection: shedding new light on a shadowy controversy. *Curr Drug Deliv.* 2007 Jul;4(3):225-31. <https://doi.org/10.2174/156720107781023938>.
34. Peterson JT. Matrix metalloproteinase inhibitor development and the remodeling of drug discovery. *Heart Fail Rev.* 2004 Jan;9(1):63-79. <https://doi.org/10.1023/b:hrev.0000011395.11179.af>.
35. Kraus RL, Pasieczny R, Lariosa-Willingham K, Turner MS, Jiang A, Trauger JW. Antioxidant properties of minocycline: neuroprotection in an oxidative stress assay and direct radical-scavenging activity. *J Neurochem.* 2005 Aug;94(3):819-27. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03219.x>.
36. Wahul AB, Joshi PC, Kumar A, Chakravarty S. Transient global cerebral ischemia differentially affects cortex, striatum and hippocampus in Bilateral Common Carotid Arterial occlusion (BCCAo) mouse model. *J Chem Neuroanat.* 2018 Oct;92:1-15. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2018.04.006>.
37. Wang WZ, Liu X, Yang ZY, Wang YZ, Lu HT. Diffusion tensor imaging of the hippocampus reflects the severity of hippocampal injury induced by global cerebral ischemia/reperfusion injury. *Neural Regen Res.* 2022 Apr;17(4):838-44. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.322468>.
38. Sharifi ZN, Abolhassani F, Zarrindast MR, Movassaghi S, Rahimian N, Hassanzadeh G. Effects of FK506 on Hippocampal CA1 Cells Following Transient Global Ischemia/Reperfusion in Wistar Rat. *Stroke Res Treat.* 2012;2012:809417. <https://doi.org/10.1155/2012/809417>.
39. Malenka RC. Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell.* 1994 Aug;78(4):535-38. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90517-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90517-7).
40. Tavares TP, Mitchell DGV, Coleman KKL, Finger E. Neural correlates of reversal learning in frontotemporal dementia. *Cortex.* 2021 Oct;143:92-108. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2021.06.016>.
41. Piau C, Mahmoudzadeh M, Kibleur A, Polosan M, David O, Wallois F. Cortical hemodynamic mechanisms of reversal learning using high-resolution functional near-infrared spectroscopy: A pilot study. *Neurophysiol Clin.* 2021 Oct;51(5):409-24. <https://doi.org/10.1016/j.neucli.2021.08.001>.
42. Blakeman S, Mareschal D. A complementary learning systems approach to temporal difference learning. *Neural Netw.* 2020 Feb;122:218-30. <https://doi.org/10.1016/j.neunet.2019.10.011>.
43. Yu CL, Li JN, Gan P, Wang LP, Yang YX, Yu DF, et al. Developing of Focal Ischemia in the Hippocampus or the Amygdala Reveals a Regional Compensation Rule for Fear Memory Acquisition. *eNeuro.* 2021 Apr;8(2):ENEURO.0398-20.2021. <https://doi.org/10.1523/eneuro.0398-20.2021>.
44. Kondo T, Yoshida S, Nagai H, Takeshita A, Mino M, Morioka H, et al. Transient forebrain ischemia induces impairment in cognitive performance prior to extensive neuronal cell death in Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J Vet Sci.* 2018 Jul;19(4):505-11. <https://doi.org/10.4142/jvs.2018.19.4.505>.
45. Andersen MB, Sams-Dodd F. Impairment of working memory in the T-maze after transient global cerebral ischemia in the Mongolian gerbil. *Behav Brain Res.* 1998 Mar;91(1-2):15-22. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(97\)00103-4](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(97)00103-4).
46. Lee D, Park J, Yoon J, Kim MY, Choi HY, Kim H. Neuroprotective effects of *Eleutherococcus senticosus* bark on transient global cerebral ischemia in rats. *J Ethnopharmacol.* 2012 Jan;139(1):6-11. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.05.024>.