

اثر استیل سالیسیلیک اسید روی نوروں‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ و یادگیری فضایی به‌دنبال انسداد موقت شریان مغزی میانی در موش‌های صحرایی نر

عباس شاهی^{۱*} Ph.D.، سید حسن افتخار واقفی^۱ Ph.D.، وحید شیبانی^۲ Ph.D.، رضا ملک پور افشار^۳ MD

۱- دانشگاه علوم پزشکی کرمان، گروه آناتومی دانشکده پزشکی

۲- مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان

۳- دانشگاه علوم پزشکی کرمان، گروه پاتولوژی دانشکده پزشکی

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: abas_shahedi2006@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۲۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۴/۲۲

چکیده

هدف: هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات (Acetyl salicylic acid) ASA روی نوروں‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ و یادگیری فضایی موش‌های صحرایی متعاقب انسداد موقت شریان مغزی میانی بود.

مواد و روش‌ها: ۴۹ سر موش صحرایی نر به‌صورت تصادفی به گروه‌های کنترل، شاهد، ایسکمی، حلال ASA و (۸۰ و ۴۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) ASA تقسیم شدند. ایسکمی موضعی مغزی با انسداد موقت شریان مغزی میانی به‌مدت ۲۰ دقیقه القا شد. حیوانات گروه ASA، ۳۰ دقیقه بعد از القای ایسکمی ASA را به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند. ۴ روز بعد از ایسکمی، حیوانات به‌مدت ۴ روز در ماز آبی موریس با سکوی مخفی جهت بررسی یادگیری فضایی آموزش داده شدند. در انتهای تست رفتاری، حیوانات کشته و نوروں‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شدند.

نتایج: با استفاده از ماز آبی موریس نشان داده شد که انسداد موقت شریان مغزی میانی سبب اختلال در یادگیری فضایی موش‌های صحرایی می‌شود و درمان با ASA نتوانست بهبودی در عمل یادگیری فضایی ایجاد کند. اما درمان با ASA میزان تخریب نورونی در ناحیه CA1 را در مقایسه با گروه دریافت کننده حلال ASA به‌طور معنی‌داری کاهش داد ($P < 0.01$).

نتیجه‌گیری: این نتایج پیشنهاد می‌کند که تزریق ASA، ۳۰ دقیقه بعد از بروز سکتة مغزی آسیب‌های نورونی متعاقب ایسکمی را در رت کاهش می‌دهد.

واژگان کلیدی: ایسکمی مغزی، هیپوکامپ، ماز آبی موریس، استیل سالیسیلیک اسید

مقدمه

ایسکمی مغزی عبارتست از کاهش متابولیت‌ها در مغز، که به دنبال کاهش جریان خون آن رخ داده و سبب کاهش اکسیژن، هایپوکسی مغزی و نهایتاً مرگ بافت مغز می‌شود (۲۱). هیپوکامپ حساس‌ترین ناحیه به ایسکمی و هایپوکسی است. هایپوکسی در این ناحیه سبب مهار پتانسیل سیناپسی می‌شود. پتانسیل سیناپسی یک مکانیسم کاهنده مصرف انرژی در سلول‌های هایپوکسیک است (۳). برقراری مجدد جریان خون منجر به آسیب مغزی بعد از یک دوره ایسکمی می‌شود. فقدان اکسیژن و مواد غذایی در جریان خون منجر به وضعیت‌هایی در بافت می‌شود که بازگشت مجدد خون به آن باعث التهاب و آسیب‌های اکسیداتیو به جای فعالیت طبیعی آن می‌شود (۴). تخریب نورونی ناحیه CA1 (Cornu Ammonis area 1) هیپوکامپ به دنبال انسداد موقت شریان مغزی میانی (Middle Cerebral Artery) که به طور مستقیم هیپوکامپ را تحت تاثیر قرار نمی‌دهد نشان داده شده است (۵). تخریب سلول‌های پیرامیدال ناحیه CA1 هیپوکامپ نشانه بارز ایسکمی مغز قدامی است که تصور می‌شود در نواقص شناختی به ویژه اختلال حافظه فضایی و آسیب‌های رفتاری مانند اختلال بیش فعالی حرکتی نقش دارد (۶). بسیاری از مطالعات آزمایشگاهی از ماز آبی برای فهم بهتر نقایص یادگیری و حافظه فضایی که به دنبال انسداد MCA رخ می‌دهد استفاده کرده‌اند (۷-۹). مواد محافظ نورونی متعددی جهت کاهش عوارض ایسکمی استفاده می‌شود که استیل سالیسیلیک اسید (ASA) از آن جمله است (۱۰-۱۲). ASA یک درمان لازم و ضروری برای بیماران با آسیب‌های مغزی ناشی از ایسکمی حاد است (۱۳). ASA در دوزهای بالا (۳ تا ۶ گرم در روز) دارای اثرات ضد التهابی در انسان است. خصوصیات ضد التهابی آن شامل کاهش استرس اکسیداتیو و مهار فعالیت نسخه برداری NF-KB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) است (۱۴). استرس اکسیداتیو یک فاکتور مهم در مرگ نورونی القا شده توسط ایسکمی است. گزارش شده است که پروکسیداسیون چربی در مراحل اولیه ایسکمی افزایش می‌یابد (۱۵). به علاوه، نشان داده شده است که تزریق دوز بالای ASA ۳۰ دقیقه بعد از ایسکمی سبب کاهش ۵۰ درصدی حجم سخته می‌شود (۱۶). همچنین گزارش شده است که ASA سرعت یادگیری را در موش‌های مسنی که در معرض ایسکمی قرار نگرفته‌اند افزایش می‌دهد (۱۷). بنابراین هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات

ASA روی نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ و همچنین یادگیری فضایی به دنبال انسداد موقت MCA در موش‌های صحرایی نر بود.

مواد و روش‌ها

حیوانات: در این مطالعه بنیادی از ۴۹ سر موش صحرایی بزرگ آزمایشگاهی نر نژاد ویستار استفاده شد. وزن موش‌ها بین ۲۵۰ تا ۳۳۰ گرم بود که از مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان تهیه شد. موش‌ها در قفس‌های ساده با آب و غذای مناسب (Pellet) تغذیه می‌شدند و در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی قرار داشتند. اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی که به تایید کمیته اخلاق مرکز تحقیقات علوم اعصاب رسیده بود رعایت شد. رت‌ها به طور تصادفی به هفت گروه هفت تایی کنترل، شاهد، ایسکمی، حلال ASA (Vehicle) و سه گروه ASA تقسیم شدند. گروه Vehicle ۳۰ دقیقه بعد از انسداد حلال ASA را دریافت کردند. گروه‌های درمان ۳۰ دقیقه بعد از انسداد دوزهای مختلف ASA (۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) (Sigma، آمریکا، ۵۳۷۶ A) را دریافت کردند.

روش ایجاد ایسکمی: حیوانات با استفاده از تزریق درون صفاقی کلرال هیدرات (۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) (Sigma، آمریکا، ۸۳۸۳ C) بی‌هوش شدند و در طول جراحی، درجه حرارت حیوان در محدوده 37 ± 0.5 درجه سانتی‌گراد ثابت بود.

انسداد MCA به شرح زیر ایجاد شد (۱۸). ابتدا جلوی گردن را به طول ۲ سانتی‌متر برش داده و شریان‌های کاروتید مشترک راست، کاروتید خارجی و داخلی نمایان شدند. سپس با ایجاد یک شکاف کوچک در شریان کاروتید مشترک یک رشته نخ نایلون ۰ تا ۳ که نوک آن گرد شده بود را وارد شریان کاروتید داخلی نموده (به طول ۲۰ تا ۲۲ میلی‌متر نسبت به محل انشعاب کاروتید مشترک) تا نوک آن وارد شریان مغزی قدامی شود. بعد از گذشت ۲۰ دقیقه از انسداد (۱۹) نخ را خارج کرده و مجدداً جریان خون برقرار گردید.

آزمایش‌های رفتاری

الف) بررسی رفتارهای نورولوژیک: رفتارهای نورولوژیک حیوان براساس آزمون پنج نمره‌ای به شرح زیر انجام گردید. شماره صفر: حرکات طبیعی. شماره ۱: خم شدن دست مقابل در زمانی که حیوان از دم آویزان می‌شود. شماره ۲: چرخش به سمت

آنالیز آماری

در بخش مربوط به یادگیری فضایی جهت مقایسه پارامترهای چهار روز اول، از آنالیز واریانس دو طرفه (Two-Way ANOVA) و پس از آن Tukey استفاده گردید. در بخش بافت‌شناسی میانگین نسبت تعداد نورونهای دژنره شده به تعداد کل نورون‌ها در هر گروه محاسبه و با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و پس از آن Tukey بین گروه‌ها مقایسه شدند. تفاوت‌ها در سطح معنی‌داری $P \leq 0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

الف) نتایج بخش رفتاری

میانگین مسافت طی شده برای یافتن سکوی مخفی ($F_{3,96}=11/357, P<0/001$) (نمودار ۱) و میانگین درصد تعداد عبور از شعاع‌های دو طرف ربع هدف ($F_{3,96}=5/414, P<0/05$) (نمودار ۲) بین گروه‌های کنترل، شاهد، ایسکمی و Vehicle تفاوت معنی‌داری را نشان داد، ولی میانگین مسافت طی شده برای یافتن سکوی مخفی ($F_{3,96}=0/707, P=0/550$)، میانگین درصد تعداد عبور از شعاع‌های دو طرف ربع هدف ($F_{3,96}=1/447, P=0/234$) و میانگین سرعت شنا کردن برای یافتن سکوی مخفی ($F_{3,96}=1/756, P=0/161$) بین گروه‌های Vehicle و (۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) ASA تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۱).

ب) نتایج بخش هیستولوژی

شکل (۱) ناحیه CA1 هیپوکامپ را در گروه‌های کنترل، Vehicle و ASA، ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم که توسط هماتوکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی شده است نشان می‌دهد.

نسبت تعداد هسته‌های پیکنوزیس به تعداد کل هسته‌ها بین گروه‌های Vehicle و (۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) ASA تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($P<0/01$) (نمودار ۳).

بحث

در این مطالعه از انسداد موقت MCA به‌عنوان یک مدل جهت القای ایسکمی و اثرات محافظ نوروئی ASA بررسی شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که تزریق داخل صفاقی مقادیر مختلف ASA در فاز حاد ایسکمی، دژنراسیون نوروئی متعاقب ایسکمی را در ناحیه CA1 هیپوکامپ کاهش می‌دهد، ولی روی

مخالف ضایعه هنگامی که حیوان از دم آویزان می‌شود، شماره ۳: چرخش به سمت مخالف ضایعه هنگامی که حیوان بر روی میز قرار داده می‌شود، شماره ۴: عدم هر گونه حرکت خود به‌خودی حیوان. برای ادامه آزمایش از حیواناتی که نمره ۱ تا ۳ داشتند، استفاده شد (۲۰).

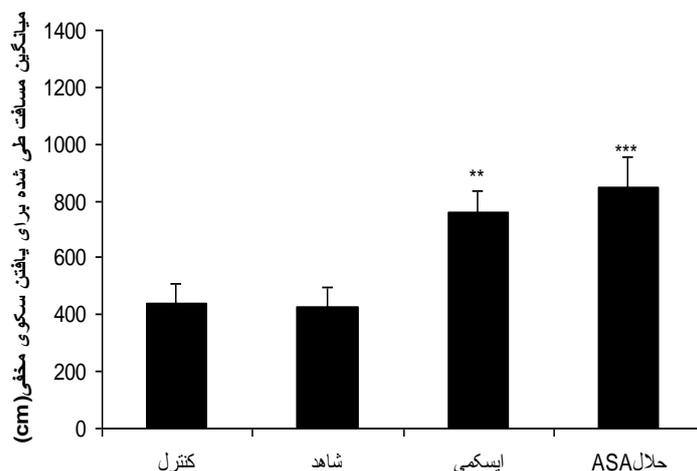
ب) ماز آبی موریس (Morris Water-maze): ماز آبی موریس شامل یک حوضچه دایره‌ای سیاه‌رنگ به قطر ۱۳۶ سانتی‌متر و ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر است که تا ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر آن با آب (20 ± 1 درجه سانتی‌گراد) پر شده و یک سکو به قطر ۱۰ سانتی‌متر در وسط یکی از ربع‌های دایره یک سانتی‌متر زیر سطح آب قرار می‌گیرد. حیوانات طی ۴ روز و هر روز ۴ مرتبه تحت آموزش قرار می‌گیرند به طوری که در هر کار آزمایشی حیوان از یکی از ربع‌های دایره در آب رها شده و ۹۰ ثانیه فرصت دارد تا سکو را پیدا کرده و به مدت ۲۰ ثانیه روی آن قرار گیرد و با استفاده از علائم خارج از ماز موقعیت مکانی سکو را به‌خاطر بسپارد. این عمل تا پایان کار آزمایشی چهارم انجام می‌شود. در هر کار آزمایشی، حرکت حیوان به وسیله یک دوربین که در بالای حوضچه نصب شده بود، فیلم‌برداری شده و توسط نرم افزار ردیاب پارامترهایی نظیر میانگین مسافت طی شده برای یافتن سکوی مخفی، میانگین درصد مسافت طی شده در ربع هدف و میانگین سرعت شنا کردن برای یافتن سکوی مخفی تجزیه و تحلیل می‌شد (۲۱).

آزمایش‌های بخش هیستولوژی: پس از انجام آزمایش‌های رفتاری حیوان را با کلرال هیدرات (۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش کرده و با تزریق قلبی محلول فیکساتور که شامل فرمالین ۴۰ درصد، اسید استیک گلاسیال و متانول هر کدام به نسبت ۸:۱:۱ بود، مغز آن را فیکس و هیپوکامپ راست آن را جدا کردیم (۲۲). سپس نمونه‌ها با پارافین قالب‌گیری شدند. بعد از قالب‌گیری، برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرومتر توسط میکروتوم (Leitz، آلمان) تهیه گردید که با روش هماتوکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی شدند.

سپس با استفاده از میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی $40 \times$ پارامترهای نظیر رنگ‌پذیری سیتوپلاسم و نکروز پان سلولار (نسبت تعداد نورون‌های حاوی هسته پیکنوزیس بر تعداد کل نورون‌ها) در ۵ میدان از هر لام تهیه شده که حاوی ۵ برش از ناحیه CA1 هیپوکامپ بود در همه گروه‌ها توسط پاتولوژیستی که از نوع درمان حیوانات بی اطلاع بود مورد شمارش قرار گرفت.

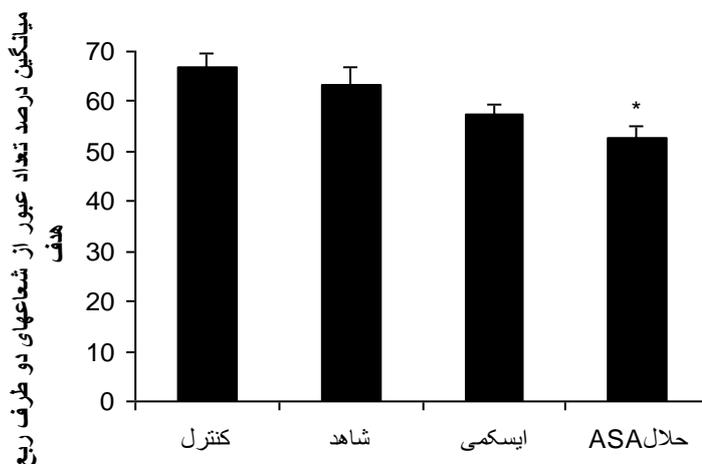
می دهد (۲۳). پژوهشگران با استفاده از مدل های متعددی، ایسکمی مغزی را در حیوانات آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار می دهند. در میان این مدل ها انسداد موقت شریان مغزی میانی بیشترین مدل استفاده شده در موش صحرایی به منظور مطالعه مکانیسم های عمل ایسکمی و درمان های بالقوه است (۲۴).

شاخص های یادگیری فضایی تاثیر معنی داری ندارد. سکنه مغزی دومین علت مرگ و میر در جهان بوده و حدود ۸۰ درصد از موارد سکنه های مغزی، ایسکمیک هستند. ایسکمی مغزی عمدتاً به دنبال کاهش یا توقف جریان خون در شریان مغزی میانی که یکی از شریان های اصلی تغذیه کننده مغز است، رخ



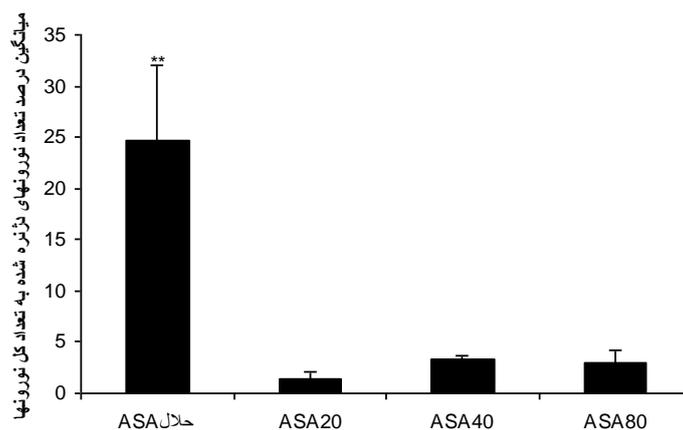
نمودار ۱: میانگین مسافت طی شده برای یافتن سکوی مخفی در ماز آبی موریس در گروه های کنترل، شاهد (شاهد جراحی)، ایسکمی و حلال ASA (n=7) در چهار

روز اول آزمایش. داده ها به صورت $\bar{X} \pm SEM$ نمایش داده شده است. (***P<0/001 با گروه کنترل و **P<0/01 با گروه کنترل).



نمودار ۲: میانگین درصدی تعداد عبور از شعاع های دو طرف ربع هدف در ماز آبی موریس در گروه های کنترل، شاهد (شاهد جراحی)، ایسکمی و حلال ASA (n=7) در

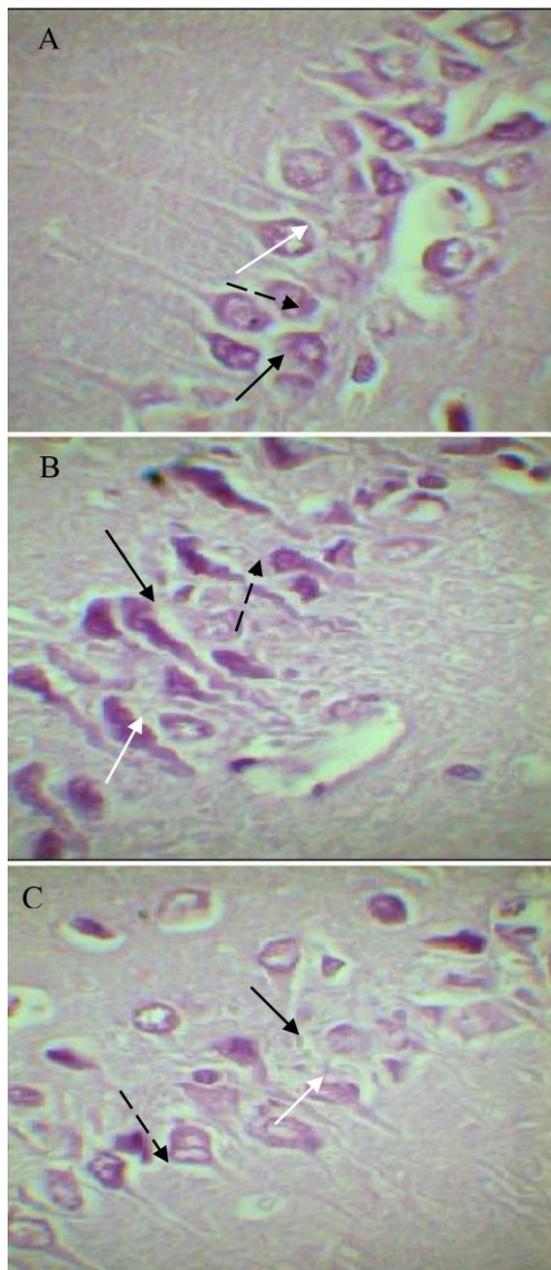
چهار روز اول آزمایش. داده ها به صورت $\bar{X} \pm SEM$ نمایش داده شده است. (*P<0/05 با گروه کنترل).



نمودار ۳: میانگین درصد تعداد نورون‌های دژنه شده به تعداد کل نورون‌ها در گروه‌های حلال ASA و (۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) ASA. داده‌ها به صورت $\bar{X} \pm SEM$ نمایش داده شده است. ($P < 0.01^{**}$ در مقایسه گروه‌های (۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) ASA با گروه حلال ASA).

جدول ۱:

(P-value)	۸۰ ASA میلی‌گرم بر کیلوگرم	۴۰ ASA میلی‌گرم بر کیلوگرم	۲۰ ASA میلی‌گرم بر کیلوگرم	حلال ASA	
P=۰/۵۵۰	±	±	±	±	میانگین مسافت طی شده برای یافتن سکوی مخفی
P= ۰/۲۳۴	±	±	±	±	میانگین درصد تعداد عبور از شعاع‌های دو طرف ربع هدف
P=۰/۱۶۱	±	±	±	±	میانگین سرعت شنا کردن برای یافتن سکوی مخفی



شکل ۱: در این شکل ناحیه CA1 هیپوکامپ که توسط همتوکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی شده در گروه‌های کنترل، حلال ASA و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ASA (به ترتیب A، B و C). در گروه کنترل: سلول‌های پیرامیدال با هسته‌های گرد، هستک‌های برجسته و سیتوپلاسم واضح قابل مشاهده می‌باشند. در گروه حلال ASA: سلول‌های آپوتوتیک با هسته شدیداً متراکم و چروکیده، هستک‌های غیرواضح و سیتوپلاسم با افزایش رنگ‌پذیری مشاهده می‌شود. در گروه ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ASA: تعداد سلول‌های آپوتوتیک با هسته‌های چروکیده و هستک‌های غیرواضح در مقایسه با گروه حلال ASA مشاهده می‌شود. بزرگنمایی $\times 400$. پیکان سفید نشان دهنده سیتوپلاسم، پیکان نقطه چین نشان دهنده هستک و پیکان سیاه نشان دهنده هسته می‌باشد.

اندوتلیال را به دنبال دارند (۲۵). اعتقاد بر اینست که برقراری مجدد جریان خون به تنهایی برای توقف آسیب‌های ناشی از ایسکمی کافی نیست و ممکن است هر مرحله از ایسکمی نیاز به درمان خاصی داشته باشد (۲۴). مواد محافظ کننده نورونی

به دنبال ایسکمی اختلالات پیچیده‌ای در نواحی مربوطه رخ می‌دهد که از جمله می‌توان به استرس اکسیداتیو، آسیب عروق ریز، اختلال عمل کرد سد خونی مغزی و التهاب اشاره نمود که همه این عوامل نهایتاً مرگ نورون‌ها، سلول‌های گلیال و

شناختی یک بخش ضروری برای فهم کلی این نقایص است. ماز آبی موريس برای ارزیابی نقایص یادگیری و حافظه فضایی استفاده می‌شود (۳۱ و ۳۲). نتایج ما نشان داد که انسداد موقت MCA سبب اختلال در یادگیری فضایی در ماز آبی موريس می‌شود که مشابه با مطالعات قبلی است (۳۱-۳۳). Morris و همکاران در سال ۱۹۸۲ نشان دادند که نورون‌های هر می ناحیه CA1 هیپوکامپ دارای نقش اساسی در یادگیری و حافظه فضایی هستند و دژنراسیون این نورون‌ها سبب اختلال در این فعالیت‌ها می‌شود (۳۴). در طول ایسکمی مغزی غلظت خارج سلولی گلوتامات به‌طور ناگهانی افزایش یافته و به سطوحی می‌رسد که سبب فعال شدن گیرنده N-methyl-D-) NMDA (aspartate) و نهایتاً مرگ نورونی می‌شود (۳۵). ASA از طریق افزایش سطوح ATP سبب کاهش آزاد شدن گلوتامات در هسته مرکزی ایسکمی و در نتیجه کاهش اثرات سمی آن روی نورون‌های مجاور می‌شود (۳۰). گلوتامات یکی از مهم‌ترین نوروترانسمیترهای تحریکی تشکیلات هیپوکامپی و CNS محسوب می‌شود که گیرنده های NMDA را فعال می‌کند، به‌طور کلی این نوع گیرنده و نوروترانسمیتر در یادگیری و حافظه فضایی نقش دارد (۳۶). در مطالعه حاضر نشان داده شد که تزریق ASA ۳۰ دقیقه بعد از ایسکمی علی‌رغم کاهش مرگ نورونی در ناحیه CA1 تاثیر معنی‌داری بر روی شاخص‌های یادگیری فضایی ندارد. Ruan و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داده‌اند که برگشت مجدد جریان خون به ناحیه ایسکمی سبب تغییرات سیناپسی مهمی از جمله افزایش ضخامت دانسیته پس سیناپسی، افزایش تعداد سیناپس‌های غیر قرینه (Asymmetric) و افزایش اتوفازای سیناپسی در ناحیه CA1 هیپوکامپ می‌شود (۳۷). اعتقاد بر این است که بیشتر از ۹۰ درصد فیبرهای گلوتامرژیک با دندریت و جسم سلولی نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ سیناپس غیر قرینه تشکیل می‌دهند (۳۸). افزایش تعداد سیناپس‌های غیر قرینه به‌دنبال ایسکمی سبب تحریک بیش از حد و نهایتاً مرگ نورونی می‌شود (۳۷). بنابراین ASA احتمالاً با مهار افزایش سیناپس‌های غیر قرینه که به دنبال ایسکمی در ناحیه CA1 هیپوکامپ رخ می‌دهد، سبب کاهش مرگ نورونی در این ناحیه می‌شود. به‌علاوه، نشان داده شده است که ایسکمی سبب تغییرات ناخوشایند و تخریب گیرنده‌های گلوتاماتی می‌شود که این تغییرات نهایتاً باعث کاهش میزان LTP (Long-Term Potentiation) می‌شود

متعددی جهت کاهش عوارض ایسکمی در مدل‌های آزمایشگاهی استفاده شده است. اما هنوز یک ماده محافظ نورونی با نتایج قابل قبول در مطالعات انسانی وجود ندارد (۲۶). در این مطالعه نشان داده شد که تزریق ASA ۳۰ دقیقه بعد از القای ایسکمی قادر به کاهش مرگ نورونی در ناحیه CA1 است. زمان نیم ساعت بعد از انسداد به‌عنوان زمان حاد در نظر گرفته می‌شود که این مرحله با تجزیه گلوتامات و تجمع مواد اگزوتوکسیک (Exotoxic) و دیگر آمینواسیدها همراه است. دلیل این واکنش‌ها برهم خوردن وضعیت انرژی و کاهش سطح ATP می‌باشد که به‌دنبال کاهش جریان خون ناحیه ایجاد می‌شود (۱۶). بنابراین کاهش مرگ نورونی به‌دنبال تزریق ASA در این زمان احتمالاً به خاطر بهبود جریان خون ناحیه توسط ASA به‌دلیل داشتن خاصیت ضد پلاکتی و در نتیجه افزایش سطح ATP است. فاز تاخیری که متعاقب این مرحله آغاز می‌شود شامل مکانیسم‌های التهابی و القای مکانیسم‌های ایمنی می‌باشد که نهایتاً مرگ سلولی را به‌دنبال دارند. پاسخ‌های التهابی به‌دنبال برقراری مجدد جریان خون افزایش یافته و با تجمعی از نوتروفیل‌ها و لکوسیت‌ها همراه است. این سلول‌ها با آزاد کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن و محصولات سابتوتوکسیک سبب آسیب بیشتر به بافت می‌شوند (۱۶). ASA به‌دلیل داشتن خاصیت ضد التهابی در دوزهای بالا می‌تواند مانع بروز پاسخ‌های التهابی از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و مهار فعالیت نسخه برداری NF-KB شود (۱۴). افتخار واقعی و همکاران نشان دادند که تزریق ASA ۳۰ دقیقه بعد از انسداد دائم جریان مغزی میانی آسیب نورونی را در ناحیه CA1 کاهش می‌دهد که مشابه یافته‌های حاضر است (۲۷). در مطالعه‌ای که Berger و همکاران در سال ۲۰۰۴ انجام دادند (۱۶) دوزهای متفاوتی از ASA را در زمان‌های متفاوت بعد از انسداد موقت MCA به حیوان تزریق کردند و نتیجه گرفتند که دوز بین ۳۰ تا ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وسعت ناحیه انفارکتوس در قشر مغز را کاهش داده و مشخصاً عمل کرد نورولوژیکی را بهبود می‌بخشد.

در مراحل اولیه ایسکمی بیان اینترلوکین-۶ (IL-6) در مغز افزایش می‌یابد (۲۸). نشان داده شده است که IL-6 دارای اثرات ضد آپوپتوتیک و محافظ نورونی است (۲۹). Berger و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که اثرات محافظ نورونی ASA همراه با افزایش غلظت IL-6 است (۳۰). از آنجایی که نقایص یادگیری و حافظه به‌دنبال ایسکمی معمول است، لذا آزمون‌های

intervals following cerebral ischemia. *Horm & behav.* 2011; 59(4): 594-604.

7. Zhang T, Pan BS, Sun GC, Sun X, et al. Diabetes synergistically exacerbates poststroke dementia and tau abnormality in brain. *Neurochem Int.* 2010; 56(8): 955-61.

8. Wang JK, Yu LN, Zhang FJ, Yang MJ, et al. Postconditioning with sevoflurane protects against focal cerebral ischemia and reperfusion injury via PI3K/Akt pathway. *Brain Res.* 2010; 1357: 142-51.

9. Kawanishi K, Koshino H, Toyoshita Y, Tanaka M, et al. Effect of mastication on functional recoveries after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *J stroke & cerebrovas Dis : the official journal of National Stroke Association.* 2010; 19(5): 398-403.

10. De Cristóbal J, Moro MA, Dávalos A, Castillo J, et al. Neuroprotective effect of aspirin by inhibition of glutamate release after permanent focal cerebral ischaemia in rats. *J Neurochem.* 2001; 79(2): 456-9.

11. Liu Y, Belayev L, Zhao W, Busto R, et al. Neuroprotective effect of treatment with human albumin in permanent focal cerebral ischemia: histopathology and cortical perfusion studies. *Europ J Pharm.* 2001; 428(2): 193-201.

12. Ohyama H, Hosomi N, Takahashi T, Mizushige K, et al. Thrombin inhibition attenuates neurodegeneration and cerebral edema formation following transient forebrain ischemia. *Brain Res.* 2001; 902(2): 264-71.

13. Meves SH, Overbeck U, Endres HG, Krogias C, et al. Dose-dependent effect of early antiplatelet therapy in acute ischaemic stroke. *Thromb Haemost.* 2012; 107(1): 69.

14. Grilli M, Pizzi M, Memo M, Spano P. Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF- κ B activation. *Science.* 1996; 274(5291): 1383-5.

15. Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, et al. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol.* 2003; 91(3A): 7A-11A.

16. Berger C, Xia F, Schabitz WR, Schwab S, et al. High-dose aspirin is neuroprotective in a rat focal ischemia model. *Brain Res.* 2004; 998(2): 237-42.

17. Smith JW, Al-Khamees O, Costall B, Naylor RJ, et al. Chronic aspirin ingestion improves spatial learning in adult and aged rats. *Pharm Biochem Behav.* 2002; 71(1): 233-8.

18. Vakili A, Zahedi-Khorasani M. Effect of aminoguanidine on post-ischemic damage in rodent model of stroke. *Pak J Pharm Sci.* 2008; 21(1): 24-8.

۳۹). القای LTP در هیپوکامپ به‌عنوان پایه و اساس یادگیری و حافظه مطرح است (۴۰).

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که ASA تعداد نورونهای آسیب دیده به‌دنبال ایسکمی را کاهش می‌دهد و این نقش را احتمالاً از طریق بهبود جریان خون، افزایش سطح ATP، جمع آوری رادیکال‌های آزاد و مهار افزایش تعداد سیناپس‌های غیر قرینه در ناحیه ایسکمیک انجام می‌دهد. در هر صورت چگونگی مکانیسم اثر ASA در پیشگیری از دژنراسیون نورونی و آسیب‌های ناشی از ایسکمی، تحقیقات بیشتری را می‌طلبد و تنها نتایج مذکور ثابت می‌کند که ASA بر روی پاتوژنز این نواحی چگونه اثر دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان به شماره ع ۸۵-۱۱ است و نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از آن مرکز ابراز می‌دارند.

منابع

- Bernard SA, Gray TW, Buist MD, Jones BM, et al. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N Engl J Med.* 2002; 346(8): 557-63.
- Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharm.* 2008; 55(3): 310-8.
- Sahay A, Hen R. Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nature neurosci.* 2007; 10(9): 1110-5.
- Huang L, Chen N, Ge M, Zhu Y, et al. Ca²⁺ and acidosis synergistically lead to the dysfunction of cortical GABAergic neurons during ischemia. *Biochem & biophys Res commun.* 2010; 394(3): 709-14.
- Danielisova V, Burda J, Nemethova M, Gottlieb M. Aminoguanidine administration ameliorates hippocampal damage after middle cerebral artery occlusion in rat. *Neurochem Res.* 2011; 36(3): 476-86.
- Milot MR, Plamondon H. Changes in HPA reactivity and noradrenergic functions regulate spatial memory impairments at delayed time
- Memezawa H, Smith ML, Siesjo BK. Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle

- cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*. 1992; 23(4): 552-9.
20. Rogers DC, Campbell CA, Stretton JL, Mackay KB. Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke*. 1997; 28(10): 2060-6.
21. Majlessi N, Kadkhodae M, Parviz M, Naghdi N. Serotonin depletion in rat hippocampus attenuates L-NAME-induced spatial learning deficits. *Brain Res*. 2003; 963(1-2): 244-51.
22. Belayev A, Saul I, Liu Y, Zhao W, et al. Enriched environment delays the onset of hippocampal damage after global cerebral ischemia in rats. *Brain Res*. 2003; 964(1): 121-7.
23. Cespedes-Rubio A, Jurado FW, Cardona-Gomez GP. p120 catenin/alphaN-catenin are molecular targets in the neuroprotection and neuronal plasticity mediated by atorvastatin after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res*. 2010; 88(16): 3621-34.
24. Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharm Biochem Behav*. 2007; 87(1): 179-97.
25. Fairbanks SL, Brambrink AM. Preconditioning and postconditioning for neuroprotection: the most recent evidence. *Best Pract Res Clin Anaesth*. 2010; 24(4): 521-34.
26. Savitz SI, Fisher M. Future of neuroprotection for acute stroke: in the aftermath of the SAINT trials. *Ann Neuro*. 2007; 61(5): 396-402.
27. Eftekhari S, Sheybani V, Aboli Nooghy Zadeh A, Malekpour R, et al. Effect of Aspirin on Morphology of CA1 Hippocampal Neurons Following Ischemia Induction in Male Rat. *Yakhteh*. 2005; 1(25): 29-34.
28. Ali C, Nicole O, Docagne F, Lesne S, et al. Ischemia-induced interleukin-6 as a potential endogenous neuroprotective cytokine against NMDA receptor-mediated excitotoxicity in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000; 20(6): 956-66.
29. Herrmann O, Tarabin V, Suzuki S, Attigah N, et al. Regulation of body temperature and neuroprotection by endogenous interleukin-6 in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003; 23(4): 406-15.
30. Berger C, Stauder A, Xia F, Sommer C, et al. Neuroprotection and glutamate attenuation by acetylsalicylic acid in temporary but not in permanent cerebral ischemia. *Experimental neurology*. 2008; 210(2): 543-8.
31. Schallert T. Behavioral tests for preclinical intervention assessment. *NeuroRx*. 2006; 3(4): 497-504.
32. Yonemori F, Yamada H, Yamaguchi T, Uemura A, et al. Spatial memory disturbance after focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996; 16(5): 973-80.
33. Schaar KL, Brenneman MM, Savitz SI. Functional assessments in the rodent stroke model. *Exp Trans Stroke Med*. 2010; 2(1): 13.
34. Morris R, Garrud P, Rawlins J, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. 1982; 297(5868): 681-3.
35. Albrecht J, Sidoryk-Węgrzynowicz M, Zielińska M, Aschner M. Roles of glutamine in neurotransmission. *Neuron Glia Biol*. 2010; 6(04): 263-76.
36. Coultrap SJ, Vest RS, Ashpole NM, Hudmon A, et al. CaMKII in cerebral ischemia. *Acta Pharm Sinica*. 2011; 32(7): 861-72.
37. Ruan YW, Han XJ, Shi ZS, Lei ZG, et al. Remodeling of synapses in the CA1 area of the hippocampus after transient global ischemia. *Neuroscience*. 2012; 218: 268-77.
38. Takács VT, Klausberger T, Somogyi P, Freund TF, et al. Extrinsic and local glutamatergic inputs of the rat hippocampal CA1 area differentially innervate pyramidal cells and interneurons. *Hippocampus*. 2012; 22(6): 1379-91.
39. Miyamoto O, Nakamura T, Yamagami SI, Negi T, et al. Depression of long term potentiation in gerbil hippocampus following postischemic hypothermia. *Brain Res*. 2000; 873(1): 168-72.
40. Lau CG, Zukin RS. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2007; 8(6): 413-26.

Effect of Acetyl Salicylic Acid on CA1 Hippocampal Neurons and Spatial Learning Following Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in Male Rats

Shahedi A, Ph.D.^{1*}, eftekhar vaghefi SH, Ph.D.², Sheibani V, Ph.D.²,
Malekpoor afshar R, MD³

1. Department of Anatomy, Kerman University of Medical Science, Kerman, Iran

2. Neuroscience Research Center, Kerman University of Medical Science, Kerman, Iran

3. Department of Pathology, Kerman University of Medical Science, Kerman, Iran

* Email corresponding author: abas_shahedi2006@yahoo.com

Received: 13 Jul. 2013

Accepted: 16 Feb. 2014

Abstract

Aim: The aim of the present study was to investigate the effects of ASA (acetyl salicylic acid) on pyramidal neurons of the hippocampal CA1 sector and spatial learning following transient middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats.

Material and Methods: Forty-nine male rat were randomly divided into control, sham, vehicle, ischemia and ASA (20, 40 and 80 mg/kg) groups. Transient focal cerebral ischemia was induced in rats by 20 min of MCAO. Animals received ASA or Vehicle by i.p 30 min after stroke onset. Four days after ischemia, animals were subjected to 4 days of training in the Morris water maze (MWM) with the invisible platform to test spatial learning. At the end of behavioral test, rats were sacrificed and pyramidal neurons in the CA1 sector were stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) and observed by light microscope.

Results: MWM showed that the MCAO caused disturbance of spatial learning in rats, and ASA treatment could not improve the spatial learning function. But, ASA treatment significantly reduced the number of degenerating neurons in hippocampal CA1 region compared with vehicle group ($P<0.01$).

Conclusions: These results suggest that ASA injection, 30 min after stroke onset in rat decreases neuronal injuries following ischemia.

Keywords: Brain ischemia, Morris Water Maze, Acetyl salicylic acid, Hippocampus