

## اثر تروگزروتین بر ایسکمی مغزی دائم در موش سوری نر

پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۰۳

دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۲۷

محمدثه محمدی<sup>۱</sup>، علی شمسیزاده<sup>۲</sup>، محمدرضا رحمانی<sup>۲</sup>، آیت کائیدی<sup>۲</sup>، جلال حسن شاهی<sup>۲</sup>، غلامرضا بازماندگان<sup>۲</sup>، الهام حکیمیزاده<sup>۲</sup>، امیر مقدم احمدی<sup>۲</sup>، محمد الله توکلی<sup>\*</sup>

۱. مرکز تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران. ۲. مرکز تحقیقات فیزیولوژی- فارماکولوژی، پژوهشکده علوم پایه پزشکی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

### چکیده

**مقدمه و هدف:** سکته مغزی یکی از کشنده‌ترین بیماری‌های نورولوژیکی و مهم‌ترین عامل ناتوانی افراد بالای ۶۵ سال می‌باشد. شاید بتوان با استفاده از مواد آنتی اکسیدان و به دنبال آن مهار مکانیسم‌های اکسیداتیو و التهاب زاء، از وقوع عوارض ایسکمی مغزی کم کرد. تروگزروتین یک ماده با خواص آنتی اکسیدانی و ضدالتهابی است که تاکنون اثرات محافظت کننده عصبی آن مورد بررسی قرار نگرفته است. در این مطالعه به بررسی اثر تروگزروتین بر آسیب مغزی ایسکمیک در موش‌های سوری نر پرداخته است.

**روش کار:** در این مطالعه تجربی از ۳۹ سر موش سوری نر (۲۵-۳۰ گرم) استفاده شد. حیوانات به سه گروه شامل: ۱. گروه شم. ۲. گروه ایسکمی مغزی. ۳. گروه ایسکمی مغزی با دریافت داروی تروگزروتین تقسیم شدند. در ابتدا در حیوانات گروه دوم و سوم ایسکمی مغزی ایجاد شد. ۵ ساعت پس از آن، گروه ۳ تروگزروتین به میزان ۳۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. سپس ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد اثر تروگزروتین بر اختلالات نورولوژیک حسی و حرکتی، ادم مغزی، حجم انفارکتوس، مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز آماری توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ و آزمون واریانس یکطرفه و دو طرفه انجام شد.

**یافته‌ها:** نتایج این مطالعه نشان داد تروگزروتین باعث کاهش حجم سکته ( $p < 0.05$ ) و ادم مغزی ( $p < 0.05$ ) در مقایسه با گروه کنترل شد. همچنین تروگزروتین عملکرد حسی-حرکتی ( $p < 0.0001$ ) و عملکرد تعادلی و توان عضلانی ( $p < 0.05$ ) را بهبود بخشید.

**نتیجه‌گیری:** درمان با تروگزروتین می‌تواند اثرات مفیدی بر روی عوارض و اختلالات ناشی از ایسکمی مغزی داشته باشد.

### کلیدواژه‌ها: ایسکمی مغزی، تروگزروتین، آنتی اکسیدان

\* نویسنده مسئول: استاد فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی- فارماکولوژی، پژوهشکده علوم پایه پزشکی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

نامابر: ۰۳۶۳۱۳۱۵۰۰۳

تلفن: ۰۳۶۳۱۳۱۵۰۸۳

ایمیل: m\_alahtavakoli@rums.ac.ir

## مقدمه

و برخی ترکیبات فعال آنها قادرند حجم ضایعه مغزی، ادم مغز و آسیب نورونی را کاهش داده و میزان اختلالات حسی، حرکتی و نوروولژیک متعاقب ایسکمی را به حداقل برسانند (۱۰-۷).

پلیفنول‌ها، ترکیبات بیولوژیکی با منشأ گیاهی هستند که حداقل دو گروه هیدروکسیل دارند (۵). پلیفنول‌ها به چهار زیر گروه شامل فلاونوئیدها، اسیدهای فولیک، استیبلن‌ها و لیگنانها تقسیم می‌شوند (۱۱). بیشترین اثرات مفید پلیفنول‌ها به دلیل خاصیت آنتیاکسیدانی آنها است (۱۲). تروگزروتین<sup>۳</sup> یا ویتامین P4 با فرمول شیمیایی C33H42O19 مشتقات تری‌هیدروکسی اتیله شده بیوفلافونوئید روتین می‌باشد که از گیاهی با نام علمی *Sophora japonica* (تلخ بیان ژاپنی) استخراج می‌گردد. این ماده به راحتی از دستگاه گوارش جذب و وارد مغز می‌شود (۱۴، ۱۵). تروگزروتین اثرات دارویی نظیر خاصیت آنتیاکسیدانی (۱۶)، ضد التهابی (۱۷)، و محافظت‌کننده سیستم عصبی (۱۸) دارد.

در مطالعات انجام شده بر روی سکته، به نقش مواد با خاصیت آنتیاکسیدان و ضدالتهاب در کاهش آسیب ایسکمیک بافت مغز اشاره شده است. همچنین با توجه به اثرات آنتی اکسیدانی و ضد التهابی اثبات شده برای تروگزروتین و به دلیل اینکه تاکنون اثرات این فلاونوئید بر روی ایسکمی مغزی گزارش نشده است. این مطالعه با هدف تعیین اثرات تروگزروتین بر آسیب‌های نورونی بافت مغز متعاقب ایسکمی در موش‌های سوری نر طراحی گردید.

## روش کار

در این مطالعه تجربی، ابتدا ۳۹ سر موش سوری نر (۳۰-۳۶ گرم) از حیوان‌خانه دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان تهیه گردید. موش‌ها به صورت تصادفی در سه گروه در قفس‌های پلاستیکی در یک چرخه ۱۲ ساعته روشنایی/ تاریکی (روشنایی از ساعت ۰۷:۰۰ تا ۱۹:۰۰) با دسترسی آزاد به غذا و آب و در دمای  $23\pm 2$  درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند. تمام مراحل آزمایشی مطابق دستورالعمل مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی در دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان انجام شد.

جهت ارزیابی اثر تروگزروتین بر آسیب‌های مغزی ناشی از ایسکمی، با توجه به مطالعات مشابه و توزیع نرمال داده‌ها حیوانات به صورت تصادفی به سه گروه سیزدهتایی زیر تقسیم شدند (۱۹).

<sup>3</sup> Troxerutin

سومین علت اصلی مرگ در جهان و نیز مهم‌ترین علت معلولیت (ناتوانی) طولانی مدت در کشورهای مهم صنعتی است. شمار تخمینی مرگ ۵/۵ میلیون نفر، به همراه ناتوانی ۴۴ میلیون نفری که سالانه در سراسر جهان می‌میرند نیز ناشی از این بیماری است (۱، ۲). بیش از ۸۰٪ موارد سکته مغزی در سراسر جهان، ایسکمیک هستند که به دنبال کاهش یا قطع جریان خون موضعی مغز، سلول‌های عصبی در مرکز قطع جریان خون (مرکز ضایعه یا Core) در چند دقیقه اول سکته مغزی از بین می‌روند و آسیب‌های اولیه را ایجاد می‌کنند. در حالی که سلول‌های عصبی که مرکز ضایعه یا پنامبرا<sup>۱</sup> را احاطه کرده‌اند، زنده بوده و قادر عملکرد طبیعی هستند که ممکن است به تدریج از بین رفته و آسیب ثانویه پس از سکته مغزی را ایجاد کنند (۳). برای این سلول‌ها قابلیت بازیابی به وسیله داروهای محافظت‌کننده عصبی<sup>۲</sup> متصور شده‌اند (۴). به همین دلیل، امروزه علاوه بر اتخاذ تدبیری برای درمانهای حل کننده لخته جهت بازکردن مجدد عروق مسدود شده، تحقیقات گسترده‌ای نیز بر روی روش‌های درمانی دارویی که از نورون‌ها در شرایط ایسکمی محافظت می‌کند متوجه شده‌است (۵).

از جمله مکانیسم‌های دیگری که منجر به ایجاد آسیب جدی به نورون‌ها و گسترش ناحیه ایسکمیک از سمت بخش مرکزی به طرف منطقه پنامبرا و در نتیجه افزایش مرگ و ناتوانی در این دسته از بیماران می‌شود، فرآیندهای التهابی هستند. استفاده از مواد و یا داروهای گیاهی که خاصیت آنتی اکسیدانی قوی دارند، ممکن است بتواند هم مغز را در مقابل آسیب‌های ناشی از اکسیدانها در سکته مغزی محافظت نموده و باعث کاهش مرگ و میر نورونی شود و هم باعث افزایش مدت زمان طلایی لازم برای استفاده از داروهای تروموبولیتیک در مراکز درمانی شوند. علاوه بر این نشان داده شده است که ترکیبات گیاهی مفید هستند و عوارض جانبی آنها بسیار کم است. بنابراین استفاده از ترکیبات گیاهی برای بسیاری از محققان در برابر محصولات مصنوعی جذاب‌تر است (۶). تاکنون مطالعات متعددی در رابطه با اثرات نوروپروتکتیو گیاهان دارویی و ترکیبات مؤثر آنها بر ایسکمی مغزی در نقاط مختلف جهان صورت گرفته که در نتیجه آن مشاهده شده که گیاهان دارویی

<sup>1</sup>Penumbra

<sup>2</sup>Neuro protection drug

رنگ قرمز و نورون‌های مرده بدون تغییر رنگ (به دلیل نبودن دهیدروژنازها) و به رنگ سفید دیده می‌شوند. برش‌ها به مدت ۲۶ ساعت در فرمالین ۱۰٪ فیکس و توسط یک اسکنر دیجیتال تصویربرداری شدن. سپس با یک نرم‌افزار پردازش گر تصویر (Image J) اندازه سطوح ناحیه انفارکتوس و ناحیه سالم در برش اندازه‌گیری شد. حجم انفارکت و میزان ادم مغزی در هر حیوان توسط دو فرمول زیر اندازه‌گیری شد. اندازه‌ها برحسب درصد بیان شدند (۲۲).

حجم انفارکتوس (درصد)= $\frac{\text{سطح انفارکتوس}}{\text{سطح نیمکره آسیب دیده-سطح نیمکره مقابل}} \times 100$   
[ ] سطح نیمکره مقابل]

ادم مغزی (درصد)= $\frac{\text{حجم نیمکره چپ}}{\text{حجم نیمکره راست}}$   
[ ] مقادیر بدست آمده در فرمول های فوق در عدد ۱۰۰ ضرب شدند تا بصورت درصد نشان داده شوند.

### ارزیابی نورولوژیکی (تست‌های رفتاری)

در مطالعه حاضر، تمام آزمایش‌های رفتاری بین ساعت ۱۰ صبح تا ۲ بعد از ظهر انجام شد و حیوانات چند ساعت قبل از گرفتن تست‌های رفتاری به محل آزمایشگاه انتقال داده شدند تا به فضای آزمایشگاه عادت نموده و در شرایط محیطی آرام و بدون سر و صدا تست‌ها گرفته شدند.

### آزمون برچسب کف دست

جهت بررسی عملکرد حسی\_حرکتی، از آزمون رفتاری برچسب کاغذی کف دست استفاده شد. جهت انجام این آزمون، تکه‌های برچسب کاغذی بریده شده در اندازه  $5 \times 5$  میلی‌متری به کار برده شد. برای این منظور، طی سه روز قبل از القای سکته مغزی، حیوانات آموزش داده شدند تا برچسب کاغذی چسبانده شده به کف دست چپ (سمت مقابل نیمکره ایسکمیک) را لمس و سپس جدا نمایند. مدت زمانی که طول کشید تا حیوان برچسب را لمس و سپس جدا نماید، به عنوان میزان فعالیت حسی حرکتی در نظر گرفته شد که هرچه این مدت زمان بیشتر باشد، اختلال حسی حرکتی بیشتر است. نمره آزمون یک بار ۱۰ دقیقه قبل از القاء ایسکمی و نیز طی دو نوبت بعد از آن (۲۴ و ۴۸ ساعت بعد) ثبت شد (۲۳).

گروه یک (n=۱۳) (شم<sup>۱</sup>): در این گروه فقط عمل جراحی صورت گرفت ولی شریان مغزی میانی (MCA) بسته نشد.  
گروه دو (n=۱۳) (کنترل ایسکمیک): در این گروه حلال دارویی پنج ساعت بعداز القای ایسکمی به صورت داخل صفاقی تزریق شد.

گروه سه (n=۱۳): در این گروه داروی تروگزروتین ۳۰۰ mg/kg پنج ساعت بعداز القای ایسکمی به صورت داخل صفاقی تزریق شد. تروگزروتین از شرکت سیگما آمریکا تهیه و خردباری شد. دوز دارو و زمان تزریق آن براساس مطالعات گذشته انتخاب گردید (۲۰، ۱۴).

### نحوه ایجاد ایسکمی

در این تحقیق، ایسکمی مغزی ایجاد شده از نوع فوکال و به روش بستن دائمی<sup>۲</sup> شریان مغزی میانی<sup>۳</sup> سمت راست از طریق القاء بی‌هوشی با داروی کاتامین، زیالازین و جراحی کرانیوتومی حیوان و براساس پروتکل مربوطه انجام شد. شریان میانی مغزی با اعمال جراحی میکروسکوپی و باز کردن جمجمه مسدود و ایسکمی مغزی در موش ایجاد گردید. به طور کلی، در این روش بعد از برداشتن قسمتی از جمجمه حد فاصل گوش و چشم راست؛ شریان میانی مغزی به وسیله دستگاه کوتر سوزانده و مسدود می‌گردد. در این روش، شاخه پروگزیمال شریان میانی مغز که بخش مهمی از کورتکس مغز و استریاتوم را تغذیه می‌کند از محل جدا شدن از حلقه ویلیس و یا شاخه دیستال مسدود می‌گردد (۲۱).

### تعیین حجم انفارکتوس و ادم مغزی

حجم انفارکتوس ۴۸ ساعت بعد از القاء سکته مغزی اندازه‌گیری شد. برای این منظور ۴۸ ساعت بعداز القاء ایسکمی حیوانات ابتدا با اتر بی‌هوش و توسط گیوتین سر از بدن جدا گردید. مغز خارج شد و توسط برین ماتریکس<sup>۴</sup> به شش بخش یک میلی‌متری کرونال برش داده شد.

برای رنگ‌آمیزی برش‌های مغزی، ابتدا آنها را درون محلول یک درصد تترازولیوم کلراید (TTC) قرار داده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. تترازولیوم کلراید با آنزیم‌های دهیدروژناز داخل سلول‌های زنده واکنش نشان داده و به رنگ قرمزی آید. سلول‌های زنده به

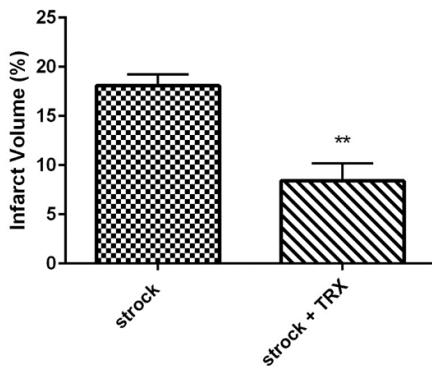
<sup>1</sup> Sham

<sup>2</sup> Permanent

<sup>3</sup> Middle Cerebral Artery

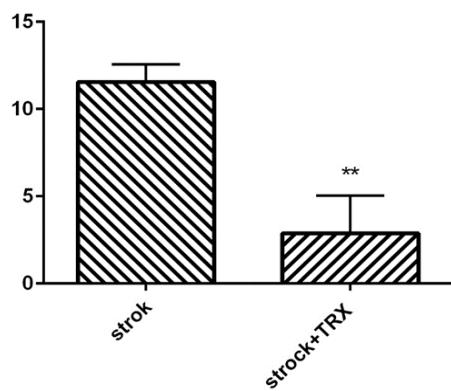
<sup>4</sup> Brain matrix

(۲/۱۸۹±۰/۴۰۷) بود. بنابراین، درمان با داروی تروگزروتین توانست حجم انفارکتوس مغزی را به میزان ۵۳/۴۷۵٪ کاهش دهد ( $p<0/01$ ).



**نمودار ۱.** اثر تروگزروتین بر حجم انفارکت در موش‌های سوری نر. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار هستند. مصرف تروگزروتین دوز ۳۰۰ mg/kg حجم انفارکت را بطور معنی‌داری در حیوانات مورد مطالعه کاهش داد. از آنجا که در گروه شم ایسکمی مغزی ایجاد نشده، حجم انفارکت صفر می‌باشد و در نمودار نشان داده نشده است.

اثر تروگزروتین بر ادم مغزی در موش‌های مورد مطالعه در نمودار ۲ آمده است که مطابق با آن ادم مغزی در گروه سکته مغزی دریافت‌کننده داروی تروگزروتین (۲/۱۸۶±۲/۸۸۷) و در گروه سکته مغزی (۱۱/۵۵) بود. این نتایج نشان داد که درمان با داروی تروگزروتین توانست ادم مغزی را بطور معنی‌داری به میزان ۷۵٪ کاهش دهد ( $p<0/005$ ).



**نمودار ۲.** اثر تروگزروتین بر ادم مغزی در موش‌های سوری نر. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار هستند. مصرف تروگزروتین با دوز ۳۰۰ mg/kg ۳۰۰ ادم مغزی را بطور معنی‌داری در حیوانات مورد مطالعه کاهش داد. در گروه شم، ایسکمی مغزی ایجاد نشده، ادم مغزی صفر می‌باشد و در نمودار نشان داده نشده است.

## آزمون کمی آویزان شدن از سیم مفتولی

به منظور بررسی عملکرد تعادلی و توان عضلانی (قدرت گرفتن دست، تعادل و استقامات) از تست کمی آویزان شدن از سیم مفتولی استفاده شد. در این تست، حیوانات از طریق دو دست بر روی یک سیم فولادی نازک (۱ میلی‌متر) که بین دو نقطه و به ارتفاع ۵۰ سانتی‌متر از سطح زمین کشیده شده است، برای مدت زمان حداقل دو دقیقه آویزان شدند. مدت زمان توانایی حیوان برای معلق ماندن بر روی سیم مفتولی به عنوان نمره آزمون در نظر گرفته شد، که هر چه کمتر باشد نشانه اختلال بیشتر است. این آزمون برای هر حیوان طی سه نوبت (۱۰ دقیقه قبل از القاء ایسکمی و ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آن) انجام شد (۲۰).

## آزمون خستگی مرکزی با سیستم نمره‌دهی میزان ارماش

جهت اندازه‌گیری خستگی مرکزی تا ۵ دقیقه حیوان را تحت کنترل و نظارت داشته و به آنها نمره داده شد: نمرات از شماره ۱ تا ۵، شامل نرمال بودن سطح هوشیاری هر حیوان عدد ۱، خفیفتر بودن سطح هوشیاری از حالت نرمال عدد ۲، افتادن پلک‌ها بر روی هم و کندشدن حرکات حیوان عدد ۳، چرت‌زدن حیوان عدد ۴ و تکان نخوردن حیوان عدد ۵ (۲۴) بود.

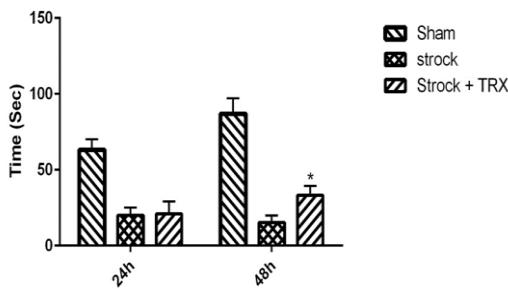
## تجزیه و تحلیل آماری

در مطالعه حاضر از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ برای آنالیز داده‌ها استفاده شد. برای آنالیز داده‌های مربوط به حجم ایفارکت و ادم مغزی از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و برای مقایسه‌های بین گروهی از آزمون تعقیبی توکی استفاده گردید. تست‌های رفتاری برچسب کف دست، میزان خستگی مرکزی و زمان آویزان ماندن روی سیم مفتولی توسط آزمون آنالیز واریانس دو طرفه برای مقایسه‌های بین گروهی از آزمون تعقیبی توکی آنالیز شد. تفاوت‌های با  $p<0/05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## نتایج

اثر تروگزروتین بر حجم انفارکتوس مغزی در موش‌های مورد مطالعه در نمودار ۱ آمده است. حجم انفارکتوس مغزی در گروه دریافت‌کننده تروگزروتین کاهش معنی‌داری داشت که در گروه ایسکمی مغزی برابر با (۲/۱۸۹±۱۸/۰۷) و در گروه ایسکمی مغزی دریافت‌کننده داروی تروگزروتین برابر با

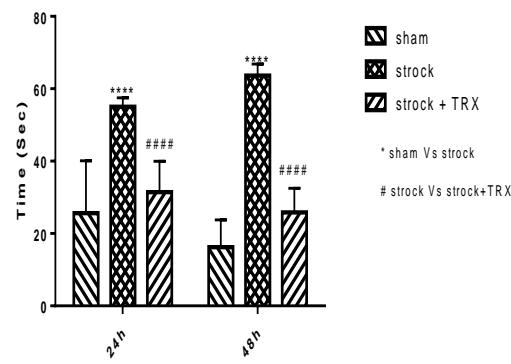
اثر تروگزروتین بر عملکرد تعادلی و توان عضلانی از طریق تست کمی آویزان شدن از سیم مفتولی در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از القاء ایسکمی مغزی در نمودار ۴ نشان داده شده است که در آن مدت زمان توانایی حیوان برای معلق ماندن بر روی سیم مفتولی در زمان ۲۴ در گروه ایسکمی مغزی  $1/50 \pm 20$  و در گروه ایسکمی مغزی دریافت‌کننده داروی تروگزروتین  $2/294 \pm 21/08$  بود که در مقایسه با گروه ایسکمی مغزی  $5/4\%$  افزایش داشت؛ اما این افزایش معنی‌دار نبود و در زمان ساعت ۴۸ مدت زمان توانایی حیوان برای معلق ماندن بر روی سیم مفتولی در گروه ایسکمی مغزی  $1/362 \pm 15/27$  و در گروه ایسکمی مغزی دریافت‌کننده داروی تروگزروتین  $1/777 \pm 33/33$  بود که مطابق با آن مصرف داروی تروگزروتین توانست مدت زمانی که حیوانات بر روی سیم مفتولی معلق می‌مانند را ۴۸ ساعت بعد از القاء ایسکمی مغزی در مقایسه با گروه ایسکمی مغزی بطور معنی‌داری به میزان  $118/27\%$  افزایش دهد ( $p < 0.05$ ) و در مقایسه با گروه ایسکمی مغزی در گروه داروی شم، گروه ایسکمی مغزی و گروه ایسکمی مغزی دریافت‌کننده داروی تروگزروتین هر دو کاهش معنی‌داری داشتند ( $p < 0.0001$ ).



نمودار ۴. اثر تروگزروتین بر عملکرد تعادلی و توان عضلانی از طریق تست کمی آویزان شدن از سیم مفتولی در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از القاء سکته مغزی در موش‌های سوری نر. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار هستند. مصرف تروگزروتین با دوز  $300 \text{ mg/kg}$  مدت زمان توانایی حیوان برای معلق ماندن بر روی سیم مفتولی در حیوانات مورد مطالعه در زمان ۴۸ را بطور معنی‌داری افزایش داد ( $p < 0.05$ )؛ اما افزایش مدت زمان توانایی حیوان برای معلق ماندن بر روی سیم مفتولی در گروه ایسکمی مغزی دریافت‌کننده داروی تروگزروتین نبست به گروه ایسکمی مغزی در زمان ۲۴ تفاوت معنی‌داری نداشت.

اثر تروگزروتین بر خستگی مرکزی با سیستم نمره دهی میزان آرامش حیوان در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از القاء ایسکمی مغزی (نمودار ۵) نشان داده شده است که در آن

اثر تروگزروتین بر عملکرد حسی\_حرکتی، از طریق آزمون رفتاری برچسب کاغذی کف دست در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از القاء سکته مغزی (نمودار ۳) نشان داده است که در زمان ۲۴ مدت زمانی که حیوانات برچسب کاغذی را از کف دست جدا می‌کردند در گروه ایسکمی مغزی دریافت‌کننده داروی تروگزروتین  $2/469 \pm 31/42$  و در گروه ایسکمی مغزی  $2/523 \pm 55$  بود که مطابق با آن مصرف داروی تروگزروتین توانست مدت زمانی که حیوانات برچسب کاغذی را از کف دست جدا می‌کردند را بطور معنی‌داری به میزان  $42/87\%$  کاهش دهد ( $p < 0.0001$ ) و در زمان ۴۸ مدت زمانی که حیوانات برچسب کاغذی را از کف دست جدا می‌کردند در گروه ایسکمی مغزی دریافت‌کننده داروی تروگزروتین  $3/169 \pm 63/64$  و در گروه ایسکمی مغزی  $1/93 \pm 25/83$  ثانیه بود که مطابق با آن مصرف داروی تروگزروتین توانست مدت زمانی که حیوانات برچسب کاغذی را از کف دست جدا می‌کردند را بطور معنی‌داری به میزان  $59/41\%$  کاهش دهد. در مقایسه با گروه شم، افزایش زمان در گروه سکته مغزی اختلاف معنی‌داری داشت ( $p < 0.0001$ ) اما افزایش زمان در گروه ایسکمی مغزی دریافت‌کننده تروگزروتین نسبت به گروه شم معنی‌دار نبود.



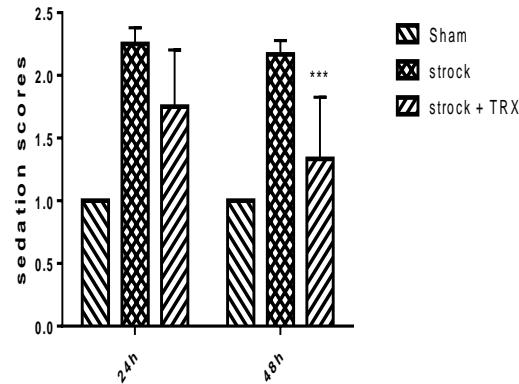
نمودار ۵. اثر تروگزروتین بر عملکرد حسی\_حرکتی از طریق آزمون رفتاری برچسب کاغذی کف دست در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از القاء سکته مغزی در موش‌های سوری نر. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار هستند. مصرف تروگزروتین با دوز  $300 \text{ mg/kg}$  مدت زمانی که حیوانات برچسب کاغذی را از کف دست جدا می‌کردند در حیوانات مورد مطالعه در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ بطور معنی‌داری کاهش داد ( $p < 0.0001$ ).

مطالعات نشان می‌دهند ترکیبات متعددی با خواص آنتی اکسیدانی از جمله پلی فنول‌ها که در برخی منابع غذایی یافت می‌شوند، قادر هستند تولید آنزیم‌های آنتی اکسیدانی را در سلول‌های مغزی افزایش دهنند (۲۶، ۲۵).

تاکنون اثرات مثبت تعداد زیادی از گیاهان دارویی در جهت تعدیل اثرات زیان بار ایسکمی-خون‌رسانی مجدد نشان داده شده است. در مطالعات مختلف مشاهده شده که گیاهان دارویی و برخی ترکیبات فعال آنها موجب کاهش حجم ضایعه مغزی، ادم مغزی، آسیب نورونی شده و می‌توانند میزان اختلالات حسی-حرکتی و نورولوژیک متعاقب ایسکمی را به حداقل برسانند. مکانیسم‌های پیشنهادشده برای اثرات حفاظتی گیاهان دارویی شامل استرس اکسیداتیو، ممانعت از قطعه قطعه شدن و آسیب اکسیداتیو DNA، کاهش فعالیت میکروگلیاهای و آستروسیت‌ها، کاهش پراکسیداسیون لیپیدها، افزایش بیان ژن-های میتوکندریالی، کاهش ایکوزانوئیدها شامل لوکوتربین، پروستابالاندین‌ها و ترومبوکسان، مهار بیان پروتئین‌های آپیوتیک، افزایش بیان پروتئین‌های ضد آپوپتوز و کاهش بیان واسطه‌های التهابی می‌باشد.

LU و همکاران اثرات محافظت‌کننده تروگزروتین را بر روی اختلالات شناختی ناشی از هیپرکلسترولمی بررسی کردند. نتایج مطالعه این محققین نشان داد که تروگزروتین باعث کاهش استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در سلول‌های هیپوکمپ موش‌ها می‌شود (۱۵). گروهی از محققان در سال ۲۰۱۷ اثر محافظت‌کننده تروگزروتین بر استرس اکسیداتیو و سطوح MMp9 در موش صحرایی نر را بررسی کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که تروگزروتین با دوز ۳۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به میزان قابل توجهی باعث افزایش فعالیت سوپراکسیدسوموتاز شد (۲۷). بیری و همکاران اثرات محافظتی تروگزروتین را بر روی مدل بیماری آلزایمر بررسی کردند. این محققین نشان دادند که تروگزروتین با دوز ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث بهبود حافظه و یادگیری در موش‌های درمان شده با بتا‌آمیلوئید می‌شود (۲۰). Elangovan و همکاران اثرات محافظت‌کننده تروگزروتین را در استرس اکسیداتیو ناشی از نیکل نشان دادند. این محققین نشان دادند که تروگزروتین می‌تواند سطح آنتی اکسیدان‌هایی مانند ویتامین C و ویتامین E، سوپراکسید دسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز شود را افزایش دهد (۲۸). Fan و همکاران اثرات آنتی اکسیدانی تروگزروتین را در مدل پیری القاء شده با دی‌گالاکتونز بررسی کردند. نتایج این

میانگین نمره خستگی مرکزی در زمان ۲۴ در گروه ایسکمی مغزی ۲/۲۵ و در گروه ایسکمی مغزی دریافت‌کننده داروی تروگزروتین ( $1/۱۳۱ \pm ۰/۰$ ) بود که در مقایسه با گروه ایسکمی مغزی ۲۲/۲٪ کاهش داشت؛ اما این کاهش معنی‌دار نبود و میانگین نمره خستگی مرکزی در زمان ۴۸ در گروه ایسکمی مغزی ۲۱/۱۶۷ و در گروه ایسکمی مغزی دریافت‌کننده داروی تروگزروتین ( $1/۱۴۲ \pm ۰/۱۳۳$ ) بود که مطابق با آن مصرف داروی تروگزروتین در گروه ایسکمی مغزی در مقایسه با گروه ایسکمی مغزی نمره خستگی مرکزی را به طور معنی‌داری به میزان ۳۸/۴٪ کاهش داد. (۰/۰۰۰۱) میانگین نمره خستگی مرکزی در زمان ۲۴ و ۴۸ در دو گروه ایسکمی مغزی و ایسکمی مغزی دریافت‌کننده داروی تروگزروتین نسبت به گروه شم، افزایش معنی‌داری داشت.



**نمودار ۵.** اثر تروگزروتین بر خستگی مرکزی با سیستم نموده‌هی میزان آرامش حیوان در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از القاء ایسکمی مغزی در موش‌های سوری نر. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار هستند. مصرف تروگزروتین با دوز ۳۰۰ mg/kg نمره خستگی مرکزی را به طور معنی‌داری در زمان ۴۸ کاهش داد (۰/۰۰۰۱)؛ اما کاهش خستگی مرکزی در زمان ۲۴ در گروه ایسکمی مغزی دریافت‌کننده تروگزروتین معنی‌دار نبود.

## بحث

به دنبال ایسکمی مغزی و یا قطع جریان خون به قسمتی از مغز غلظت اکسیژن و مواد متابولیکی به سرعت در نواحی ایسکمیک مغز کاهش پیدا می‌کند که سبب اختلال در عملکرد میتوکندری‌ها و تولید رادیکال‌های آزاد و بدنبال آن تولید استرس اکسیداتیو می‌گردد. یکی از راه حل‌ها برای کاهش استرس اکسیداتیو، استفاده از آنتی اکسیدانها جهت کاهش رادیکال‌های آزاد می‌باشد (۱۷).

بومادران<sup>۳</sup> بر پیامد ناشی از سکته مغزی در موش‌های صحرایی ماده اوارکتومی شده پرداختند که نتایج حاصل از آن، کاهش حجم سکته مغزی، کاهش اختلالات حسی و حرکتی و نورولوژیک بود (۱۰).

### نتیجه‌گیری

از یافته‌های مطالعه حاضر نتیجه‌گیری می‌شود که درمان با تروگزروتین دارای اثرات مفیدی (از جمله کاهش حجم ضایعه و ادم مغزی) بر روی عوارض و اختلالات ناشی از ایسکمی مغزی می‌باشد. نتایج مطالعه پیشنهاد می‌کند با توجه به اثر محافظت کننده عصبی مشاهده شده از تروگزروتین، این آنتی اکسیدان به همراه فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی نوترکیب (r-tPA) که تنها داروی مورد تأیید FDA (برای درمان ایسکمی مغزی) است، بصورت ترکیبی و در خارج از زمان طلایبی r-tPA استفاده شود.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل پایان نامه خانم محمدی دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی و طرح شماره ۹۶۰۶۹، دارای کد اخلاق از دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان به شماره IR.RUMS.REC.1396.86 است که بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان تقدیر و تشکر می‌شود.

### تعارض منافع

نویسنده‌گان این مطالعه هیچ‌گونه تعارض منافعی نداشتند.

مطالعه نشان داد که تروگزروتین می‌تواند باعث افزایش گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز در موش‌های پیر شود (۱۷). مطالعه Zhang و همکاران اثر محافظتی عصاره غنی از فلاونوئید رزتاکی<sup>۱</sup> بر روی رت‌های نر نژاد اسپراغ-دالی مبتلا به ایسکمی مغزی را مورد بررسی قرار داده که موجب افزایش بقاء رت‌ها، کاهش قطعه قطعه شدن DNA، کاهش بیان مولکول‌های آپویتوزیس، افزایش بیان پروتئین‌های ضد آپویتوز، کاهش بیان واسطه‌های التهابی شد (۲۹).

نتایج به دست‌آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که تجویز تروگزروتین به عنوان یک بیوفلافانوئید گیاهی بعد از وقوع ایسکمی مغزی باعث کاهش حجم سکته و ادم مغزی می‌شود. همچنین در این مطالعه اثر تروگزروتین بر عملکرد حسی و حرکتی از طریق آزمون رفتاری برچسب کاغذی کف دست بررسی شد که مطابق با آن مصرف داروی تروگزروتین توانست مدت زمانی که حیوانات برگسب کاغذی را از کف دست جدا می‌کردند نسبت به گروه کنترل بطور معنی‌داری کاهش دهد. در این مطالعه اثر تروگزروتین بر عملکرد تعادلی و توان عضلانی از طریق تست کمی آوبیزان شدن از سیم مفتولی نیز بررسی شد که مطابق با آن مصرف داروی تروگزروتین توانست مدت زمانی که حیوانات بر روی سیم مفتولی معلق می‌ماندند را نسبت به گروه کنترل افزایش دهد که تنها در ۴۸ ساعت پس از ایسکمی این افزایش معنی‌دار بود.

همسو با نتایج پژوهش حاضر، محققان در سال ۲۰۰۴ به بررسی اثر ترکیب اپی گالو کاتچین گالات از چای سبز بر روی موش‌های نر نژاد اسپراغ-دالی مبتلا به ایسکمی مغزی پرداختند که نتایج حاصل از آن کاهش حجم ضایعه مغزی، کاهش نمره نقایص نورولوژیک، کاهش مالون دی آلدید و گلوتاتیون اکسیدشده بود (۷). Wang و همکاران اثرات محافظت‌کننده عصبی اسانس اسطوخودوس بر روی رت‌های نر نژاد ویستار مبتلا به ایسکمی مغزی را بررسی کردند که نتایج آن، کاهش نمره نقایص نرولوژیک، حجم ضایعه مغزی و استرس اکسیداتیو بود (۸). علیمحمدی و همکاران به بررسی عصاره گیاه پنج انگشت<sup>۲</sup> بر روی موش‌های سوری اوارکتومی شده مبتلا به سکته مغزی پرداختند که نتایج حاصل از آن، کاهش حجم سکته مغزی، اختلالات نرولوژیک و اختلالات حسی و رفتاری بود (۹). ایمانی و همکاران به بررسی اثر عصاره

<sup>1</sup> Rosaceae

<sup>2</sup> Vitesx agnus castus

## References

1. Hankey GJ, Warlow CP. Treatment and secondary prevention of stroke: evidence, costs, and effects on individuals and populations. *Lancet*. 1999;354(9188):1457-63.
2. Shimazawa M, Chikamatsu S, Morimoto N, Mishima S, Nagai H, Hara H. Neuroprotection by Brazilian green propolis against *in vitro* and *in vivo* ischemic neuronal damage. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*. 2005;2(2):201-7.
3. Doyle KP, Simon RP, Stenzel Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*. 2008;55(3):310-8.
4. Segura T, Calleja S, Jordan J. Recommendations and treatment strategies for the management of acute ischemic stroke. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2008;9(7):1071-85.
5. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010;15(10):7313-52.
6. Elango C, Jayachandran KS, Niranjali Devaraj S. Hawthorn extract reduces infarct volume and improves neurological score by reducing oxidative stress in rat brain following middle cerebral artery occlusion. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2009;27(8):799-803.
7. Choi YB, Kim YI, Lee KS, Kim BS, Kim DJ. Protective effect of epigallocatechin gallate on brain damage after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Research*. 2004;1019 (1-2):47-54.
8. Wang D, Yuan X, Liu T, Liu L, Hu Y, Wang Z, et al. Neuroprotective activity of lavender oil on transient focal cerebral ischemia in mice. *Molecules*. 2012;17(8):9803-17.
9. Alimohamadi R, Naderi S, Imani E, Shamsizadeh A, Mobini M, Rezazadeh H, et al. The effects of the ethanolic extract of vitex agnus castus on stroke outcomes in ovariectomized mice. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2015;17(3):20-7. (in Persian)
10. Imani E, Esmaili A, Alimohammadi R, Ehsani V, Shmasizadeh A, Mobini M, et al. Effects of Achillea millefolium on the Consequences of Stroke in Ovariectomized Rats. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*. 2015;22(6):1725-36. (in Persian)
11. Rodríguez M, Estrela J, Ortega Á. Natural polyphenols and apoptosis induction in cancer therapy. *Journal of Carcinogenesis and Mutagenesis*. 2013;6.
12. Lloni AA, Longhini R, Lopes GC, de Mello JC, Scarminio IS. Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catigua*. *Analytica Chimica Acta*. 2012;719:57-60.
13. Geetha R, Radika MK, Priyadarshini E, Bhavani K, Anuradha CV. Troxerutin reverses fibrotic changes in the myocardium of high-fat high-fructose diet-fed mice. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2015;407(1-2):263-79.
14. Lu J, Wu DM, Zheng YL, Hu B, Cheng W, Zhang ZF, et al. Troxerutin counteracts domoic acid-induced memory deficits in mice by inhibiting CCAAT/enhancer binding protein beta-mediated inflammatory response and oxidative stress. *Journal of Immunology*. 2013;190 (7):3466-79.
15. Lu J, Wu DM, Zheng ZH, Zheng YI, Hu B, Zhang ZF. Troxerutin protects against high cholesterol-induced cognitive deficits in mice. *Brain*. 2011;134(3):783-97.
16. Zhang ZF, Zhang Yq, Fan SH, Zhuang J, Zheng YL, Lu J, et al. Troxerutin protects against 2', 4, 4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47)-induced liver inflammation by attenuating oxidative stress-mediated NAD<sup>+</sup>-depletion. *Journal of Hazardous Materials*. 2015;283:98-109.
17. Fan SH, Zhang ZF, Zheng YL, Lu J, Wu DM, Shan Q, et al. Troxerutin protects the mouse kidney from d-galactose-caused injury through anti-inflammation and anti-oxidation. *International Immunopharmacology*. 2009;9(1):91-6.
18. Lu J, Wu DM, Hu B, Cheng W, Zheng YL, Zhang ZF, et al. Chronic administration of troxerutin protects mouse brain against D-galactose-induced impairment of cholinergic system. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2010;93(2):157-64.
19. Rahmani MR, Shamsizadeh A, Moghadam-Ahmadi A, Kaeidi A, Allahtavakoli M. Monoacylglycerol lipase inhibitor, JZL-184, confers neuroprotection in the mice middle cerebral artery occlusion model of stroke. *Life Sciences*. 2018;198:143-8. (in Persian)
20. Babri S, Amani M, Mohaddes G, Alihemmati A, Ebrahimi H. Protective effects of troxerutin on β-amyloid (1-42)-induced impairments of spatial learning and memory in rats. *Neurophysiology*. 2012;44(5):387-93. (in Persian)
21. Allahtavakoli M, Amin F, Esmaeeli Nadimi A, Shamsizadeh A, Kazemi Arababadi M, Kennedy D. Ascorbic acid reduces the adverse effects of delayed administration of tissue plasminogen activator in a rat stroke model. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 2015;117(5):335-9. (in Persian)
22. Xing B, Chen H, Zhang M, Zhao D, Jiang R, Liu X, et al. Ischemic postconditioning inhibits

- apoptosis after focal cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat. *Stroke*. 2008;39(8):2362-9.
23. Sims NR, Muyderman H. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010;1802(1):80-91.
24. Lee VC, Moscicki JC, DiFazio CA. Propofol sedation produces dose-dependent suppression of lidocaine-induced seizures in rats. *Anesthesia and Analgesia*. 1998;86(3):652-7.
25. Tulsulkar J, Shah ZA. Ginkgo biloba prevents transient global ischemia-induced delayed hippocampal neuronal death through antioxidant and anti-inflammatory mechanism. *Neurochemistry International*. 2013;62(2):189-97.
26. Warner DS, Sheng H, Batinić Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *Journal of Experimental Biology*. 2004;207(18):3221-31.
27. Zamanian M, Hajizadeh MR, Esmaeili Nadimi A, Shamsizadeh A, Allahtavakoli M. Antifatigue effects of troxerutin on exercise endurance capacity, oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 levels in trained male rats. *Fundamental and Clinical Pharmacology*. 2017;31(4):447-55. (in Persian)
28. Elangovan P, Pari L. Ameliorating effects of troxerutin on nickel-induced oxidative stress in rats. *Redox Report*. 2013;18(6):224-32.
29. Zhang S, Qi Y, Xu Y, Han X, Peng J, Liu K, et al. Protective effect of flavonoid-rich extract from Rosa laevigata Michx on cerebral ischemia-reperfusion injury through suppression of apoptosis and inflammation. *Neurochem International*. 2013;63(5):522.

## Effect of Troxerutin on permanent cerebral ischemia in male mice

Received: 16 May 2020

Accepted: 23 Jun 2020

**Mohadeseh Mohammadi<sup>1</sup>, Ali Shamsizadeh<sup>2</sup>, Mohammadreza Rahmani<sup>2</sup>, Ayat Kayedi<sup>2</sup>, Jalal Hasanshahi<sup>2</sup>, Gholamreza Bazmandegan<sup>2</sup>, Elham Hakimizadeh<sup>2</sup>, Amir Moghadam Ahmadi<sup>2</sup>, Mohammad Allahtavakoli<sup>2\*</sup>**

1. Student Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran 2. Physiology-Pharmacology Research Center, Research Institute of Basic Medical Sciences, Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

### Abstract

**Introduction:** Stroke is a neurological disease and one of the leading causes of death all over the world. It is also an important cause of disability in people over age over 65. It may be possible to reduce the incidence of cerebral ischemia using antioxidants, followed by inhibition of oxidative and inflammatory mechanisms. Troxerutin is a natural bioflavonoid with antioxidant and anti-inflammatory properties. However, its neuroprotective effects have not yet been studied. The present study aimed to investigate the effect of troxerutin on ischemic brain damage in male mice.

**Materials and Methods:** In this experimental study, 39 male mice (30-25 grams) were used. The animals were divided into three groups: 1. Sham group 2. Ischemic brain group 3. The ischemic brain group, receiving troxerutin drug. Cerebral ischemia was induced in the second and third groups of mice. Five hours later, group 3 received 300 mg/kg troxerutin intraperitoneal injection. After 24 and 48 hours, the effect of troxerutin on sensory and motor neurological disorders, cerebral edema, and infarct volume was investigated. Analysis of variance test was performed by SPSS software (21) using one-way and two-way.

**Results:** The results indicated that troxerutin reduced stroke volume ( $p=0.05$ ) and cerebral edema ( $p=0.05$ ) compared with the control group. Troxerutin also improved sensory-motor function ( $p<0.0001$ ) and balance function and muscle strength ( $p<0.05$ )

**Conclusion:** Treatment with troxerutin can have beneficial effects on complications and disorders caused by cerebral ischemia.

**Keywords:** Cerebral ischemia, Troxerutin, Antioxidant

**\*Corresponding Author:** Professor of Physiology, Physiology-Pharmacology Research Center, Research Institute of Basic Medical Sciences, Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

Email: m\_alahtavakoli@rums.ac.ir

Tel: +983431315083

Fax: +983431315003