اثر تروگزروتین بر ایسکمی مغزی دایم در موش سوری نر

دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۲۷ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۰۳

محدثه محمدی[۱]، علی شمسی‌زاده[۲]، محمدرضا رحمانی[۲]، آیت کائیدی[۲]، جلال حسن‌شاهی[۲]، غلامرضا بازماندگان[۲]، الهام حکیمی‌زاده[۲]، امیر مقدم احمدی[۲]، محمد اله‌توکلی[۲*]

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 التهاب‌زا، 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 پرداخته‌است.

روش کار: در این مطالعه تجربی از ۳۹ سر موش سوری نر (۳۰-۲۵ 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 mg/kg ۳۰۰ به‌صورت 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 ($p<۰/۰۵$) و ادم مغزی ($p<۰/۰۵$) در مقایسه با گروه کنترل شد. همچنین تروگزروتین عملکرد حسی_حرکتی ($p<۰/۰۰۰۱$) و عملکرد تعادلی و توان عضلانی ($p<۰/۰۵$) را بهبود بخشید.

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

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

ایمیل: m_alahtavakoli@rums.ac.ir **تلفن:** ۰۳۴۳۱۳۱۵۰۸۳ **نمابر:** ۰۳۴۳۱۳۱۵۰۰۳

مقدمه

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 حالی‌که سلول‌های عصبی که مرکز ضایعه یا پنامبرا[1] را احاطه کرده‌اند، زنده بوده و فاقد 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[2] متصور شده‌اند (۴). به همین دلیل، امروزه علاوه بر اتخاذ تدابیری برای درمانهای حل‌کننده لخته جهت بازکردن مجدد عروق مسدودشده، تحقیقات گسترده‌ای نیز بر روی روش‌های درمانی دارویی که از نورون‌ها در شرایط ایسکمی محافظت می‌کند متمرکز 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 اکسیدآنها 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 ترومبولیتیک 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 و برخی ترکیبات فعال آنها قادرند حجم ضایعه مغزی، ادم مغز و آسیب نورونی را کاهش داده و میزان اختلالات حسی، حرکتی و نورولوژیک 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 فنولیک، استیلبن‌ها و لیگنآنها تقسیم می‌شوند (۱۱). بیشترین اثرات مفید پلی‌فنول‌ها به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی آنها است (۱۲). تروگزروتین[3] یا ویتامین P4 با فرمول شیمیایی C33H42O19 (۱۳) نوعی فلاونوئید از مشتقات تری‌هیدروکسی اتیله شده بیوفلاونوئید 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 شده‌است. 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 نشده‌است. 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 (۳۰-۲۵ 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 الی ۱۹:۰۰) با دسترسی آزاد به غذا و آب و در دمای ۲±۲۳ 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).

[1] Penumbra
[2] Neuro protection drug
[3] Troxerutin

گروه یک (n=۱۳) (شم[1]): 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 خریداری شد. دوز دارو و زمان تزریق آن براساس مطالعات گذشته انتخاب گردید (۱۴، ۲۰).

نحوه ایجاد ایسکمی

در این تحقیق، ایسکمی مغزی ایجاد شده از نوع فوکال و به روش بستن دائمی[2] شریان مغزی میانی[3] سمت راست از طریق القاء بی‌هوشی با داروی کتامین، زایلازین 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. به‌طور 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 می کند 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[4] به شش بخش یک میلی‌متری کرونال برش داده‌شد.

برای رنگ‌آمیزی برش‌های مغزی، ابتدا آنها را درون محلول یک درصد تترازولیوم‌کلراید (TTC) قرار داده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. تترازولیوم کلرید با آنزیم‌های دهیدروژناز داخل سلول‌های زنده واکنش نشان داده و به رنگ قرمز درمی‌آید. سلول‌های زنده به رنگ قرمز و نورون‌های مرده بدون تغییر رنگ (به دلیل نبودن دهیدروژنازها) و به رنگ سفید دیده می‌شوند. برش‌ها به مدت ۲۴ ساعت در فرمالین ۱۰٪ فیکس و توسط یک اسکنر دیجیتال تصویربرداری شدند. سپس با یک نرم‌افزار پردازش‌گر 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)=سطح انفارکتوس اندازه گیری شده × {۱-[(سطح نیمکره آسیب دیده-سطح نیمکره مقابل)/ سطح نمیکره مقابل}]

ادم مغزی (درصد)= (حجم نیمکره چپ- حجم نیمکره راست)/ 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 ۵× ۵ میلی‌متری به کار برده‌شد. برای این منظور، طی سه روز قبل از القای سکته مغزی، حیوانات آموزش داده‌شدند تا برچسب کاغذی چسبانده‌شده 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 گرفته‌شد 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).

[1] Sham
[2] Permanent
[3] Middle Cerebral Artery
[4] Brain matrix

آزمون کمی آویزان شدن از سیم مفتولی

به منظور بررسی عملکرد تعادلی و توان عضلانی (قدرت گرفتن دست، تعادل و استقامت) از تست کمی آویزان شدن از سیم مفتولی استفاده‌شد. 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 شده‌است، برای مدت زمان حداکثر دو دقیقه آویزان شدند. مدت زمان توانایی حیوان برای معلق ماندن بر روی سیم مفتولی به عنوان نمره آزمون در نظر گرفته‌شد، 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 آرامش

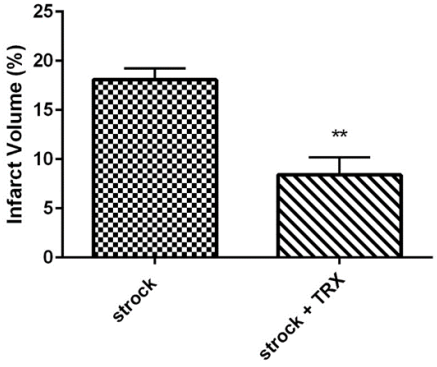
جهت اندازه‌گیری خستگی مرکزی تا ۵ دقیقه حیوان را تحت کنترل و نظارت داشته و به آنها نمره داده شد: نمرات از شماره ۱ تا ۵، شامل نرمال بودن سطح هوشیاری هر حیوان عدد ۱، خفیف‌تر بودن سطح هوشیاری از حالت نرمال عدد ۲، افتادن پلک‌ها بر روی هم و کندشدن حرکات حیوان عدد ۳، چرت‌زدن حیوان عدد ۴ و تکان نخوردن حیوان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

تجزیه و تحلیل آماری

در مطالعه حاضر از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ برای آنالیز داده‌ها استفاده‌شد. برای آنالیز داده‌های مربوط به حجم اینفارکت 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 $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

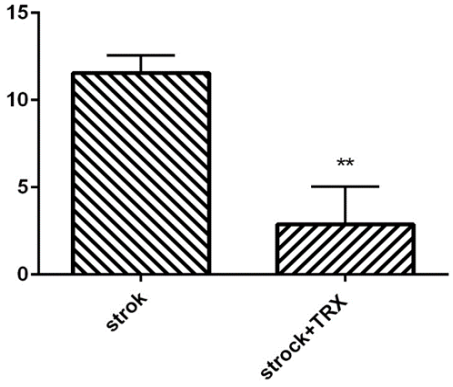
نتایج

اثر تروگزروتین بر حجم انفارکتوس مغزی در موش‌های مورد مطالعه در نمودار ۱ آمده‌است. حجم انفارکتوس مغزی در گروه دریافت کننده تروگزروتین کاهش معنی‌داری داشت که در گروه ایسکمی مغزی برابر با (۱۸/۰۷±۲/۱۸۹) و در گروه ایسکمی مغزی دریافت‌کننده داروی تروگزروتین برابر با (۸/۴۰۷±۲/۱۸۹) بود. بنابراین، درمان با داروی تروگزروتین توانست حجم انفارکتوس مغزی را به میزان ۵۳/۴۷۵٪ کاهش دهد ($p<۰/۰۱$).



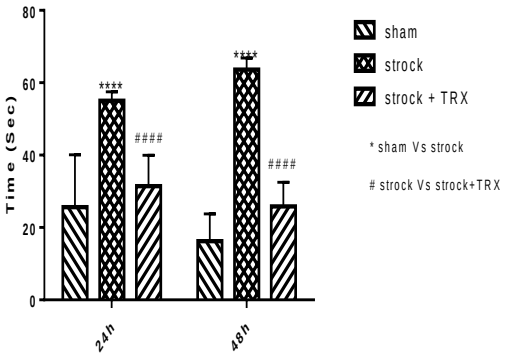
نمودار ۱. اثر تروگزروتین بر حجم انفارکت در موش‌های سوری نر. داده‌ها به صورت میانگین± انحراف معیار هستند. مصرف تروگزروتین دوز ۳۰۰ mg/kg حجم انفارکت را بطور معنی‌داری در حیوانات مورد مطالعه کاهش داد. ($p<۰/۰۱$**). از آنجا که در گروه شم ایسکمی مغزی ایجاد نشده، حجم انفارکت صفر می‌باشد و در نمودار نشان داده نشده‌است.

اثر تروگزروتین بر ادم مغزی در موش‌های مورد مطالعه در نمودار ۲ آمده‌است که مطابق با آن ادم مغزی در گروه سکته مغزی دریافت‌کننده داروی تروگزروتین (۲/۸۸۷±۲/۱۸۶) و در گروه سکته مغزی (۱۱/۵۵±۲/۱۸۶) بود. این نتایج نشان داد که درمان با داروی تروگزروتین توانست ادم مغزی را بطور معنی‌داری به میزان ۷۵٪ کاهش دهد ($p<۰/۰۰۵$).



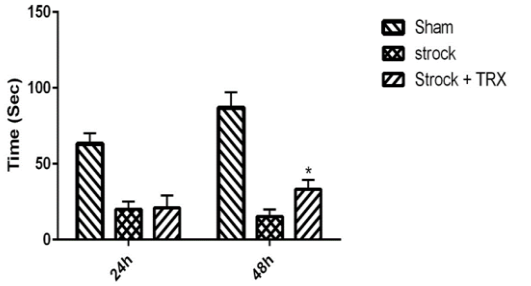
نمودار ۲. اثر تروگزروتین بر ادم مغزی در موش‌های سوری نر. داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار هستند. مصرف تروگزروتین با دوز ۳۰۰ mg/kg ادم مغزی را بطور معنی‌داری در حیوانات مورد مطالعه کاهش داد. ($p<۰/۰۰۵$**). در گروه شم، ایسکمی مغزی ایجاد نشده، ادم مغزی صفر می‌باشد و در نمودار نشان داده‌نشده است.

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 (۳۱/۴۲±۲/۴۶۹) و در گروه ایسکمی مغزی (۵۵±۲/۵۲۳) 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 ۴۲/۸۷٪ کاهش دهد (p<۰/۰۰۰۱) و در زمان ۴۸ مدت زمانی که حیوانات برچسب کاغذی را از کف دست جدا می‌کردند در گروه ایسکمی مغزی دریافت‌کننده داروی تروگزروتین (۲۵/۸۳±۱/۹۳) و در گروه ایسکمی مغزی (۶۳/۶۴±۳/۱۶۹) 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 ۵۹/۴۱٪ کاهش دهد. (p<۰/۰۰۰۱) و در مقایسه با گروه شم، افزایش زمان در گروه سکته مغزی اختلاف معنی‌داری داشت (p<۰/۰۰۰۱) اما افزایش زمان در گروه ایسکمی مغزی دریافت کننده تروگزروتین نسبت به گروه شم معنی‌دار نبود.



نمودار ۳. اثر تروگزروتین بر عملکرد حسی_حرکتی ازطریق 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±انحراف‌معیار هستند. مصرف تروگزروتین با دوز ۳۰۰ 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<۰/۰۰۰۱).

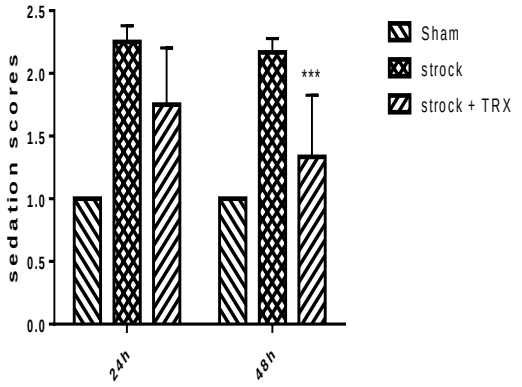
اثر تروگزروتین بر عملکرد تعادلی و توان عضلانی از طریق تست کمی آویزان شدن از سیم مفتولی در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از القاء ایسکمی مغزی در نمودار ۴ نشان داده شده‌است که در آن مدت زمان توانایی حیوان برای معلق ماندن بر روی سیم مفتولی در زمان ۲۴ در گروه ایسکمی مغزی (۲۰±۱/۵۰) و در گروه ایسکمی مغزی دریافت‌کننده داروی تروگزروتین (۲۱/۰۸±۲/۲۹۴) بود که در مقایسه با گروه ایسکمی مغزی ۵/۴٪ افزایش داشت؛ اما این افزایش معنی‌دار نبود و در زمان ساعت ۴۸ مدت زمان توانایی حیوان برای معلق ماندن بر روی سیم مفتولی درگروه ایسکمی مغزی (۱۵/۲۷±۱/۳۶۲) و در گروه ایسکمی مغزی دریافت‌کننده داروی تروگزروتین (۳۳/۳۳±۱/۷۷۷) بود که مطابق با آن مصرف داروی تروگزروتین توانست مدت زمانی که حیوانات بر روی سیم مفتولی معلق می‌ماندند را ۴۸ ساعت بعد از القای ایسکمی مغزی در مقایسه با گروه ایسکمی مغزی بطور معنی‌داری به میزان ۱۱۸/۲۷٪ افزایش دهد (p<۰/۰۵) و در مقایسه با گروه شم، گروه ایسکمی مغزی و گروه ایسکمی مغزی دریافت‌کننده داروی تروگزروتین هر دو کاهش معنی‌داری داشتند (p<۰/۰۰۰۱).



نمودار ٤. اثر تروگزروتین بر عملکرد تعادلی و توان عضلانی ازطریق 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 ۳۰۰ mg/kg مدت زمان توانایی حیوان برای معلق‌ماندن بر روی سیم مفتولی در حیوانات مورد مطالعه در زمان ۴۸ را بطور معنی‌داری افزایش داد (p<۰/۰۵)؛ اما افزایش مدت زمان توانایی حیوان برای معلق ماندن بر روی سیم مفتولی در گروه ایسکمی مغزی دریافت کننده داروی تروگزروتین نسبت 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 شده‌است که در آن

میانگین نمره خستگی مرکزی در زمان ۲۴ در گروه ایسکمی مغزی ۲/۲۵ و درگروه ایسکمی مغزی دریافت‌کننده داروی تروگزروتین (۱/۷۵۰±۰/۱۳۱) بود که در مقایسه با گروه ایسکمی مغزی ۲۲/۲۲٪ 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 (۱/۳۳۳±۰/۱۴۲) بود که مطابق با آن مصرف داروی تروگزروتین درگروه ایسکمی مغزی در مقایسه با گروه ایسکمی مغزی نمره خستگی مرکزی را به طورمعنی‌داری به میزان ۳۸/۴۸٪ کاهش داد. ($p<۰/۰۰۰۱$) 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 نمره‌دهی میزان آرامش حیوان در زمان۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از القاء ایسکمی مغزی در موش‌های سوری نر. داده ها به صورت میانگین±انحراف معیار هستند. مصرف تروگزروتین با دوز ۳۰۰ mg/kg نمره خستگی مرکزی را به طور معنی‌داری در زمان ۴۸ کاهش داد ($p<۰/۰۰۰۱$)؛ اما کاهش خستگی مرکزی در زمان ۲۴ در گروه ایسکمی مغزی دریافت‌کننده تروگزروتین معنی‌دار نبود.

بحث

به دنبال ایسکمی‌مغزی 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 راه‌حل‌ها برای کاهش استرس اکسیداتیو، استفاده از آنتی اکسیدآنها جهت کاهش رادیکال‌های آزاد می‌باشد (۱۷).

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

تاکنون اثرات مثبت تعداد زیادی از گیاهان دارویی در جهت تعدیل اثرات زیان بار ایسکمی–خون‌رسانی مجدد نشان داده شده‌است. 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 کاهش استرس اکسیداتیو، ممانعت از قطعه قطعه شدن و آسیب اکسیداتیو DNA ،کاهش فعالیت میکروگلیاها و آستروسیت‌ها، کاهش پراکسیداسیون لیپیدها، افزایش بیان ژن-های میتوکندریایی، کاهش ایکوزانوئیدها شامل لوکوترین، پروستاگلاندین‌ها و ترومبوکسان، مهار بیان پروتئین‌های آپپتوتیک، 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 تروگزوتین باعث کاهش استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در سلول‌های هیپوکمپ موش‌ها می‌شود (۱۵). گروهی از محققان در سال ۲۰۱۷ اثر محافظت-کننده 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 سوپراکسیددسموتاز شد (۲۷). ببری 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 بتا آمیلوئید می‌شود (۲۰). Elangovan و همکاران اثرات محافظت کننده تروگزروتین را در استرس اکسیداتیو ناشی از نیکل نشان دادند. این محققین نشان دادند که تروگزروتین می‌تواند سطح آنتی اکسیدان‌هایی مانند ویتامینC، ویتامین E، سوپر اکسید دسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز وکاتالاز شود را افزایش دهد (۲۸). Fan و همکاران اثرات آنتی اکسیدانی تروگزروتین را در مدل پیری القاء شده با دی‌گالاکتوز بررسی کردند. نتایج این

مطالعه نشان داد که تروگزروتین می‌تواند باعث افزایش گلوتاتیون پراکسیداز وکاتالاز در موش‌های پیر شود (۱۷).

مطالعه Zhang و همکاران اثر محافظتی عصاره غنی از فلانوئید رزتاکی[1] بر روی رت‌های نر نژاد اسپراگ–دالی مبتلا به ایسکمی مغزی را مورد بررسی قرار داده که موجب افزایش بقاء رت‌ها، کاهش قطعه قطعه شدن DNA، کاهش بیان مولکول‌های آپوپتوزیس، افزایش بیان پروتئین‌های ضد آپوپتوز، کاهش بیان واسطه‌های التهابی شد (۲۹).

نتایج به دست‌آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که تجویز تروگزروتین به عنوان یک بیوفلاونوئید 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 برچسب 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 ازطریق تست کمی آویزان 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 اسپراگ–دالی مبتلا به ایسکمی مغزی پرداختند که نتایج حاصل از آن کاهش حجم ضایعه مغزی، کاهش نمره نقایص نورولوژیک، کاهش مالون دی آلدهید 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[2] 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 بومادران[3] 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 طلایی r-tPA استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل پایان نامه خانم محدثه محمدی دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی و طرح شماره۹۶۰۶۹، 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

نویسندگان این مطالعه هیچ‌گونه تعارض منافعی نداشتند.

[1] Rosaceae
[2] Vitesx agnus castus
[3] Achillea millefolium

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, Jayachandaran 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 Ovarectomized Rats. Journal of Shahid Sadoughi Univercity 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. Lonni 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 Yl, 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, 2′, 4, 4′-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47)-induced liver inflammation by attenuating oxidative stress-mediated NAD+-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 mode. 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 Troxerotin on permanent cerebral ischemia in male mice

Received: 16 May 2020 Accepted: 23 Jun 2020

Mohadeseh Mohammadi [1], Ali Shamsizadeh [2], Mohammadreza Rahmani [2], Ayat Kayedi[2], Jalal Hasanshahi[2], Gholamreza Bazmandegan[2], Elham Hakimizadeh[2], Amir Moghadam Ahmadi[2], Mohammad Allahtavakoli[2*]

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