اثر کارنوزین بر خیز مغزی و شاخص‌های بیوشیمیایی اکسیداتیو استرس درمدل ایسکمی مغزی–موضعی موقتی در موش صحرایی

عابدین وکیلی[۱*](Ph.D)،احمدرضا بندگی[۲](Ph.D)،سعید بیاتی[۱](M.D)، رویا حسن‌زاده[۱](M.D)، یاسین اسدی[۱](M.Sc)

۱- دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات و گروه فیزیولوژی، آزمایشگاه تحقیقاتی عروقی-مغزی

۲- دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی،گروه بیوشیمی

چکیده

سابقه و هدف: کارنوزین یک دی‌پپتید اندوژن است که در تعداد زیادی از بافت از جمله مغز بیان می‌شود و اثرات محافظتی در مقابل آسیب ایسکمی مغزی دارد. با این وجود اثر آن بر خیز مغزی، که یکی از متغیرهای مهم تعیین‌کننده میزان آسیب‌های ثانویه پس از سکته مغزی است، به‌درستی روشن نیست. این تحقیق با هدف بررسی اثر کارنوزین بر خیز مغزی و شاخص‌های بیوشیمیای اکسیداتیو استرس در یک مدل تجربی ایسکمی مغزی موضعی انجام شد.

مواد و روش‌ها: ایسکمی مغزی با مسدود کردن موقتی شریان میانی به مدت یک ساعت ایجاد و با کمک جریان‌سنج لیزری در موش صحرایی تایید شد. ال-کارنوزین در دوز mg/kg.ip ۵۰۰ و ۲۵۰ بلافاصله بعد از ایجاد ایسکمی تزریق شد. خیز مغزی و میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و میزان مالون‌دی‌آلدئید ۲۴ ساعت بعد از ایسکمی با روش استاندارد و کیت اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها:تجویز کارنوزین با دوز mg/kg ۲۵۰ (۸۱/۵±۰/۳۶٪) و mg/kg ۵۰۰ (۸۰/۹±۰/۳۰٪)باعث کاهش معنی‌دار خیز مغزی به میزان ۲۵٪ و ۴۰٪ به ترتیب در مقایسه با گروه شاهد (۸۲/۵۳±۰/۱۶٪) شد (P<۰/۰۰۱). هم‌چنین، کارنوزین به‌طور معنی‌داری فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکساید دیسموتاز و آنتی‌اکسیدانت کل را افزایش داده و میزان مالون‌دی‌آلدئید را در بافت ایسکمی مغز کاهش داد (P<۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری:نتایج نشان داد، کارنوزین اثر محافظتی در مقابل خیز مغزی در مدل تجربی سکته مغزی دارد. این اثر احتمالاً از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت اندوژن، مهار تولید رادیکال‌های آزاد و تضعیف اکسیداتیو استرس اعمال می‌شود.

واژه‌های کلیدی: کارنوزین، ایسکمی مغز، خیز مغز ، اکسیداتیو استرس، موش صحرایی.

مقدمه

خیز مغزی تجمع غیر طبیعی آب در فضای پارانشیم مغز است و از علل اصلی افزایش آسیب نرولوژیکی بوده و عامل حدود نیمی از مرگ و میر بیماران در فاز حاد سکته و ضربه‌های مغزی است[۲،۱]. خیز مغزی فشار داخل جمجمه را افزایش داده و باعث اختلال در جریان خون و اکسیژن‌رسانی به مغز شده و در نهایت باعث افزایش آسیب مغزی می‌شود [۲].

* نویسنده مسئول، تلفن:۰۹۱۲۲۳۱۹۵۳۴نمابر:۳۳۵۴۱۶۱-۰۲۳۱ Email: ab.vakili@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۴/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۹/۲۵

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2023-03-22]

با وجود تلاش‌های زیادی که در دهه‌های گذشته صورت گرفته است، هنوز درمان موثری برای خیز مغزی وآسیب‌های نرولوژیکی ناشی از آن در کلینیک یافت نشده است [۵-۳]. شاید این مسئله به این دلیل باشد، مکانیسم‌های پیچیده متعددی از جمله توکسیستی ناشی گلوتامات، اکسیداتیو استرس و رادیکال‌های آزاد، عوامل التهابی، آپوپتوزیس و غیره در ایجاد خیز مغزی و آسیب ثانویه پس سکته مغزی دخالت دارند[۶]. لذا یافتن داروهایی که بتوانند مسیر مختلف مولکلولی آسیب‌رسان را هم‌زمان مهار نمایند، ممکن است برای کاهش خیز مغزی و یا آسیب‌های ثانویه پس از سکته مغزی مفید باشند.

کارنوزین یک دی‌پپتید اندوژن است که از آمینواسیدهای بتاآلانین و هیستیدین و با کمک آنزیم کارنوزین سینتتاز در بسیاری از بافت از جمله سیستم عصبی مرکزی ساخته می‌شود [۷]. کارنوزین در مغز عمدتاً به‌وسیله سلول‌های گلیال تولید می‌گردد [۸]. شواهد پژوهشی نشان می‌دهند، کارنوزین دارای خواص‌های بیولوژیکی مختلفی از قبیل ضد اکسیدانتی قوی و جمع‌کننده رادیکال‌های آزاد [۷،۴]، اثر محافظتی در مقابل توکسیستی ناشی گلوتامات [۹]، ضد آپوپتوزیس [۱۱،۱۰]، ضد التهابی [۹]، شیلات‌کننده فلزات سنگین[۹] بافرکنندگی اسید در سلول [۱۲] دارد. با توجه به این‌که کارنوزین دارای فعالیت بیولوژیکی متعددی است، اخیراً به‌عنوان یک کاندید درمانی برای آسیب سکته مغزی مورد توجه محققین قرار گرفته است. در همین رابطه پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند، کارنوزین آسیب‌های ناشی از سکته مغزی را در مدل‌های مختلف حیوانی کاهش می‌دهد [۱۵-۱۳،۱۱-۹،۳]. با این وجود اثر آن بر خیز مغزی، که یکی از متغیرهای مهم تعیین‌کننده میزان آسیب‌های ثانویه پس از سکته مغزی است، به‌درستی روشن نیست.

لذا این تحقیق با هدف بررسی اثر کارنوزین بر خیز مغزی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت از قبیل سوپراکسیداز دیسموتاز (Superoxide dismutase, SOD) و گلوتاتیون پرکسیداز (Glutathione peroxidase, GPx) و مالون‌دی‌آلدئید (Malondialdehydem,MDA)، محصول پراکسیداسیون غشائ سلول‌ها، آنتی‌اکسیدانت کل (Ferric-reducing antioxidant power,FRAP) به‌عنوان شاخص‌های بیوشیمیایی استرس اکسیداتیو، در مدل تجربی ایسکمی مغزی موضعی انجام شد.

مواد و روش‌ها

حیوانات .در این مطالعه از تعداد ۴۶ سر موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (۳۴۰-۳۰۰ گرم) استفاده گردید. حیوانات در شرایط استاندارد و دسترسی آزاد به آب و غذا نگه‌داری شد و کلیه آزمایشات مطابق آئین‌نامه کمیته اخلاق پژوهشی و با شماره مجوز (۹۲/۳۴۳۸۳۳) کمیته اخلاق دانشگاه در مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی سمنان در سال ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ انجام گردید.

مراحل مختلف آزمایش و گروه‌بندی حیوانات.مرحله اول آزمایش: برای بررسی اثر کارنوزین بر خیز مغزی ۲۸ سر موش صحرائی به ۴ گروه ۷ تایی به ترتیب زیر تقسیم شدند. گروه۱: کنترل کاذب(Sham) که در این گروه فقط عمل جراحی صورت گرفته ولی شریان میانی مغز بسته نمی‌شد. گروه ۲: کنترل (حلال دارو) که در این گروه بلافاصله پس از انسداد شریان میانی مغز سالین به‌عنوان حلال دارو (۱ ml/kg) به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. گروه ۳ و ۴: کارنوزین(سیگما-آلمان) در دوز۲۵۰ mg/kgو ۵۰۰mg/kg[۹،۱۴]وبلافاصله پس از ایجاد ایسکمی به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد.

در همه این گروه‌ها ایسکمی با تایید دستگاه جریان‌سنج لیزری ایجاد شد و ۲۴ ساعت بعد از ایسکمی درصد خیز و محتوای آب مغز با روشی که در ذیل آمده است بررسی شد.

مرحله دوم آزمایش: جهت بررسی اثر کارنوزین بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت از قبیل سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و مالون‌دی‌آلدئید و FRAP (به‌عنوان شاخص آنتی‌اکسیدانت کل) در بافت مغز، ۱۸ سر موش صحرائی به ۳ گروه ۶ تایی به‌ترتیب زیر تقسیم شد. گروه ۱:

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2023-03-22]

کنترل کاذب(Sham) در این گروه فقط عمل جراحی صورت گرفته ولی شریان میانی مغز بسته نمی‌شد. گروه ۲: کنترل (حلال) در این گروه بلافاصله پس از انسداد شریان میانی مغز سالین (۱ ml/kg)به‌عنوان حلال دارو به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. گروه ۳: کارنوزین در دوزmg/kg ۵۰۰(موثرترین دوز در مرحله اول آزمایش) بلافاصله بعد از ایجاد ایسکمی به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد.

در همه این گروه‌ها ۲۴ ساعت بعد از شروع ایسکمی مغز حیوان خارج گردیده و میزان فعالیت آنزیم‌های SOD, GPX, FRAPو مقادیر MDA به ترتیبی که در ذیل آمده است، اندازه‌گیری شد.

ایجاد ایسکمی مغزی موضعی. جهت ایجاد ایسکمی مغزی موضعی- موقتی، ابتداء موش‌های صحرایی با تزریق کلرال‌هیدرات (Fluka-آلمان) با دوزmg/kg ip ۴۰۰داخل صفاقی بی‌هوش شدند. بعد از اطمینان از عمیق بودن بی‌هوشی، جهت ثبت جریان خون موضعی مغز، ابتدا پوست ناحیه گیج‌گاهی زاویه بین چشم و گوش حیوان برش داده و عضله گیج‌گاهی در محل چسبندگی به استخوان جدا شد و پس ایجاد از حفره‌ای کوچک در سطح استخوان گیج‌گاهی پروب جریان‌سنج لیزری دراین ناحیه ثابت گردید و جریان خون پایه موضعی مغز ثبت شد. سپس با جراحی میکروسکوپی شریان‌های کاروتید مشترک و شاخه‌های آن کاروتید خارجی و داخلی از بافت‌های اطراف جدا و مجزا شد. شریان کاروتید خارجی و شریان کاروتید مشترک به‌صورت دائمی و شریان کاروتید داخلی به‌وسیله میکروکلامپ به‌طور موقت مسدود گردید. سپس نخ نایلون با شماره ۳/۰ که نوک آن جلو شعله گرده شده بود را از طریق برشی کوچک که در شریان کاروتید خارجی ایجاد گردیده وارد شریان کاروتید داخلی شده و به آرامی به‌داخل مغز هدایت شد تا جریان خون موضعی به کم‌تر از ۱۵٪ تا ۲۰٪ میزان پایه کاهش یابد [۱۶]. شصت دقیقه بعد از انسداد شریان میانی مغز نخ نایلون به آرامی خارج و جریان خون مجدد برای ۲۳ ساعت برقرار شد. در طول شصت دقیقه ایسکمی وتا ۱۵ دقیقه بعد از خارج کردن نخ جریان خون موضعی مغز توسط دستگاه جریان‌سنج لیزری ثبت و یادادشت شد. در ضمن درجه حرارت حیوان از طریق رکتال کنترل و در تمام طول مدت جراحی تا بهوش آمدن کامل حیوان در محدوده فیزیولوژیک نگه‌داشته شد.

روش اندازه‌گیری خیز مغزی. بیست و چهار ساعت پس از ایسکمی حیوان کشته شده و مغز به‌دقت خارج گردید. سپس پیاز بویای و پل مغزی را جدا نموده و نیمکره ایسکمیک (راست) و غیر ایسکمیک (چپ) مغز را با کمک Brain Matrixو با دقت بسیار زیاد جدا نموده و وزن مرطوب دو نیمکره به‌وسیله ترازوی دقیق اندازه‌گیری شد. در ادامه جهت به‌دست آوردن وزن خشک هر نیمکره آن‌ها را در داخلoven با درجه حرارت ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. برای محاسبه محتوای آب مغز و درصد خیز مغزی از فرمول‌های زیر استفاده شد[۱۷،۱۸].

۱۰۰ ×وزن مرطوب نیمکره /(وزن خشک نیمکره- وزن مرطوب نیمکره)= درصد محتوای آب مغز

درصد وزن مرطوب نیمکره غیر ایسکمیک- درصد وزن مرطوب نیمکره ایسکمیک = درصد خیز مغز

اندازه‌گیری سطح فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در بافت مغز

بیست و چهار ساعت بعد از ایسکمی مغزی، حیوان تحت بی‌هوشی عمیق کشته و مغز خارج شده و کورتکس از بقیه قسمت‌های مغز با دقت جدا شده و در ظرف مخصوص در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش نگه‌داری شد. نمونه‌ها در هنگام آزمایش در بافر مخصوص هموژنیزه و در G ۲۰۰۰۰ سانتریفوژ شدند. سپس از محلول رویی(Supernatant)نمونه جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های SODوGPX و تعیین مقادیرMDA،FRAPو پروتئین استفاده شد.

فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز و با استفاده از کیت‌های شرکت راندوکس Randox (Laboratories, Crumlin, UK)و بر اساس دستورالعمل

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2023-03-22]

شرکت سازنده و با کمک دستگاه فتومتر (Stat fax 3300-USA) اندازه‌گیری شد. برای تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد. برای این منظور دو میلی‌لیتر از محلول برادفورد به ۴۰ میکرولیتر از محلول هموژنیزه نمونه بافتی اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. سپس در طول موج ۵۹۵ نانومتر و در برابر بلانک معرف جذب آن قرائت گردید و منحنی استاندارد با استفاده از سرم آلبومین گاوی رسم و غلظت پروتئین بافت بر اساس آن اندازه‌گیری شد [۱۹].

اندازه‌گیری مقدار مالون‌دی‌آلدئید در بافت مغز. از روش تیوباربیتوریک اسید برای اندازه غلظت بافتی مالون‌دی‌آلدئید استفاده شد. به‌طور خلاصه، برای اندازه‌گیری مقدار مالون‌دی‌آلدئید دربافت ایسکمیک مغز، ۲۵۰ میکرولیتر از محلول رویی نمونه اولیه را با ۱/۵ میلی‌لیتر اسیدفسفریک ۱٪ و نیم میلی‌لیتر محلول آبی تیوباربیتوریک اسید ۰/۶٪ مخلوط کرده و به مدت ۴۵ دقیقه در دستگاه بن‌ماری قرار داده می‌شد. پس از خنک شدن دو میلی‌لیتر محلول n-butanol به محلول فوق افزوده شده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ G سانتریفیوژ شد. محلول رویی نمونه به یک لوله تازه منتقل گشته وجذب نوری آن در طول موج ۵۳۵ نانومتر اندازه‌گیری گردید و با منحنی استاندارد که از محلول‌های استاندارد تهیه شده از ۳،۳،۱،۱ تترامتیل پروپان به‌دست می‌آید، خوانده شد. مقدار مالون‌دی‌آلدئید بر حسب نانومول بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد [۲۰].

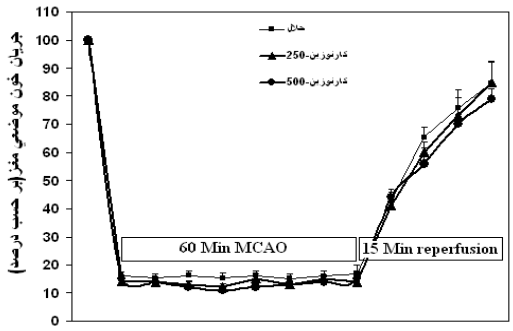
اندازه‌گیری میزان آنتی‌اکسیدانت کل بافت مغز. از روش Ferric-reducing antioxidant power برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانت کل بافت مغز استفاده شد [۲۱]. به‌طور خلاصه در این روش مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر معرف FRAP را با ۵۰ میکرولیتر نمونه روی آماده شده مخلوط کرده و به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و انکوبه می‌شد. سپس جذب نوری (OD) در ۵۹۳ نانومتر تعیین شد. از محلول $FeSO_4$ برای کالیبره کردن استفاده گردید. مقادیر به‌دست آمده FRAP به‌صورت μmol/mg of protein بیان شد.

روش تجزیه و تحلیل آماری. آزمون آماری نشان داد، توزیع داده در مورد درصد آب مغز، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی و مالون‌دی‌آلدئید نرمال بود، بنابراین برای مقایسه بین گروه‌ها از آزمون پارامتریک One Way ANOVA و Holm-Sidak method به‌عنوان Post-hoc analysis برای آنالیز آماری استفاده شد. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار نمونه (Mean ± SEM) بیان شده است. در صورتی که P<۰/۰۵ بود اختلاف بین گروه معنی‌دار تلقی می‌گردید. از نرم‌افزار (SigmaStat 3.0, Jandel Scientific, Erkrath Germany) برای آنالیز نتایج استفاده شد.

نتایج

۱- جریان خون موضعی. اندازه‌گیری جریان خون موضعی مغز به‌وسیله جریان‌سنج لیزری نشان داد، مسدود کردن شریان میانی مغز باعث شد تا جریان خون موضعی به کم‌تر از ۱۵٪ سطح پایه در گروه‌های سالین و درمان با کارنوزین در هر دو دوز کاهش یابد و بعد از رفع انسداد جریان خون موضعی به نزدیک ۹۰٪ پایه افزایش یافت. اختلاف معنی‌داری بین جریان خون موضعی مغز در گروه‌های مورد مطالعه وجود نداشت (P>۰/۰۵،شکل ۱).

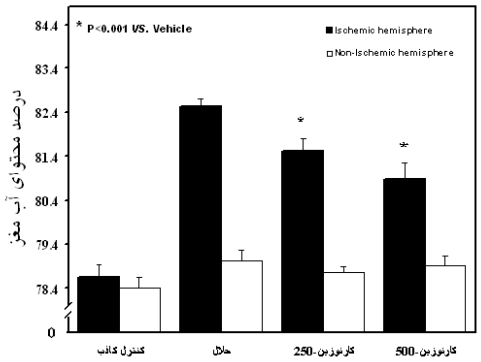
شکل ۱. جریان خون موضعی قبل از انسداد شریان میانی مغز (MCAO) و در طول ۶۰ دقیقه MCAO و ۱۵ دقیقه بعد از



برقراری مجدد جریان خون(Reperfusion) در موش های صحرایی که حلال (سالین) و یا کارنوزین در دوز های 250 mg/kg و500 mg/kg در شروع ایسکمی دریافت کرده اند را نشان می‌دهد.

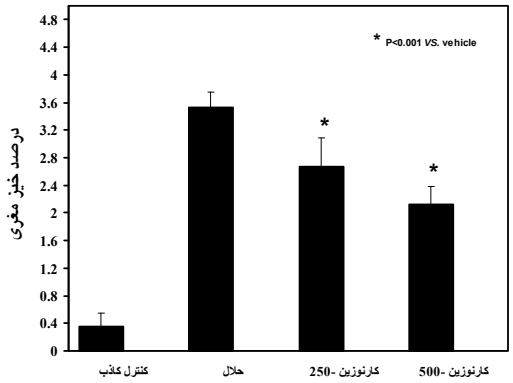
[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2023-03-22]

۲- تاثیر کارنوزین بر میزان خیز مغزی. محتوای آب مغز بیست و چهار ساعت بعد از جراحی در نیمکره‌های غیر ایسکمیک (چپ) در گروه کنترل کاذب (۷۸/۴±۰/۲۳٪)، گروه حلال (۷۹/۱±۰/۲۴٪) و در گروه درمان با کارنوزین با دوز ۲۵۰ mg/kg (۷۸/۷۶±۰/۱۴٪)و در دوز mg/kg ۵۰۰ (۷۸/۹۳±۰/۲۲٪)بود، که اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد (P>۰/۰۵، نمودار ۲). ایجاد ایسکمی مغزی موضعی به طور معنی‌داری باعث افزایش محتوای آب مغز در نیمکره ایسکمیک (۸۲/۵۳±۰/۱۶٪) و ۳/۵۳ درصدی خیز مغزی در مقایسه با گروه کنترل کاذب شد (P<۰/۰۰۱، نمودار ۲و۳). تجویز کارنوزین با دوز mg/kg ۲۵۰ (۸۱/۵±۰/۳۶٪)وmg/kg ۵۰۰ (۸۰/۹±۰/۳۰٪)در شروع ایسکمی باعث کاهش معنی‌دار محتوای آب مغز و خیز مغزی به میزان ۲۵٪ و ۴۰٪ به ترتیب در مقایسه با گروه حلال و یا کنترل شد (P<۰/۰۰۱، شکل ۲و۳).

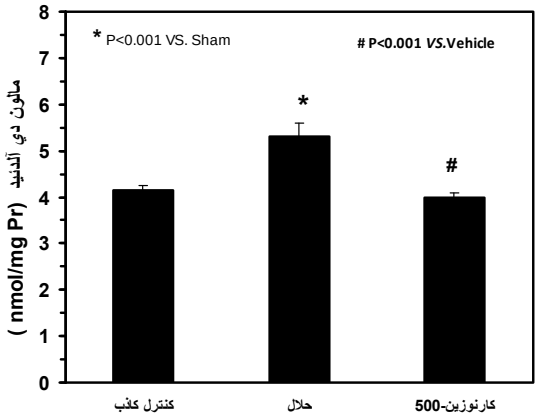


شکل ۲.در صد محتوای آب مغز در نیمکره ایسکمیک (راست) و نیمکره غیر ایسکمیک (چپ) در گروه های کنترل کاذب و حلال- ایسکمیک (Vehicle) و کارنوزین در دوز هایmg/kg ۲۵۰ وmg/kg ۵۰۰ را بیست و چهار ساعت بعد جراحی یا ایسکمی مغزی موضعی در موش صحرایی نشان میدهد.

۳- **تاثیر کارنوزین بر میزان مالون‌دی‌آلدئید در بافت مغز.** مقدار مالون‌دی‌آلدئید در بافت کورتکس مغز بیست و چهار ساعت بعد از جراحی در گروه کنترل کاذب ۴/۱۳±۰/۱۱ nmol/mg Protein بود. ایجاد ایسکمی مغزی باعث شد، مقدار مالون‌دی‌آلدئید(nmol/mg Protein۵/۳۱±۰/۲۷)به‌طور معنی‌داری افزایش یابد(P≤۰/۰۰۱).تجویز کانوزین با دوز mg/kg ۵۰۰ در شروع ایسکمی باعث کاهش معنی‌دار مقدار مالون‌دی‌آلدئید(۴/۰۱±۰/۰۶ nmol/mg Protein) در مقایسه با گروه حلال شد (شکل۴، P≤۰/۰۰۱).



شکل ۳در صد خیز مغز در گروه های کنترل کاذب (Sham)، حلال (vehicle) و کارنوزین در دوز های mg/kg ۲۵۰ و mg/kg ۵۰۰ را بیست و چهار ساعت بعد جراحی یا ایسکمی مغزی موضعی در موش صحرایی نشان می‌دهد.

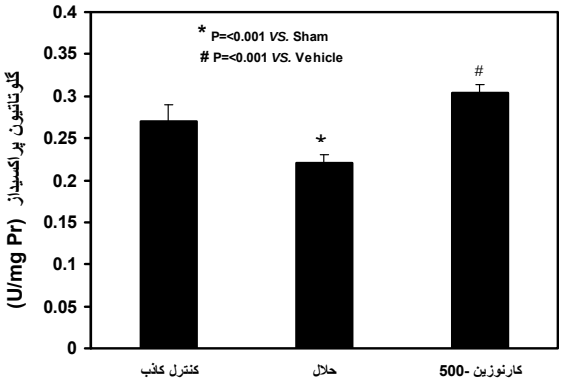


شکل ۴. مقادیر مالون دی الدئید (nmol/mg Protein) در در گروه های کنترل کاذب (Sham)، حلال (Vehicle) و کارنوزین در دوز mg/kg۵۰۰ را بیست و چهار ساعت بعد جراحی یا ایسکمی را نشان می‌دهد.

۴- **تاثیر کارنوزین بر سطح فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز و مقدار آنتی‌اکسیدانت کل در بافت مغز.** میزان آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در بافت ایسکمیک مغز در گروه کنترل کاذب U/mg Protein ۰/۲۷±۰/۰۱ بود، ایجاد سکته مغزی باعث کاهش معنی‌داری

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2023-03-22]

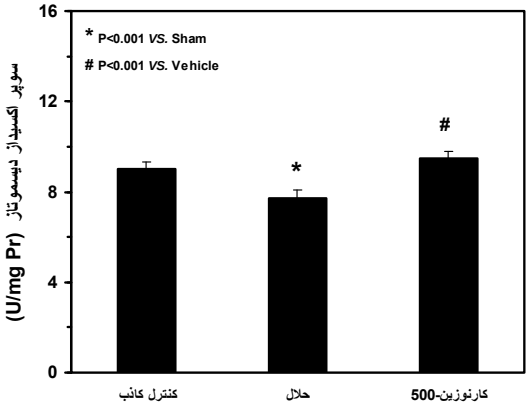
فعالیت بافتی آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (U/mg Protein ۰/۲۲±۰/۰۲) شد(P=۰/۰۰۲). تزریق کارنوزین با دوز ۵۰۰ mg/kgدر شروع ایسکمی باعث افزایش معنی‌دار فعالیت بافتی آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (U/mg Protein ۰/۳۰±۰/۰۱) شد (شکل۵،P=۰/۰۰۲).



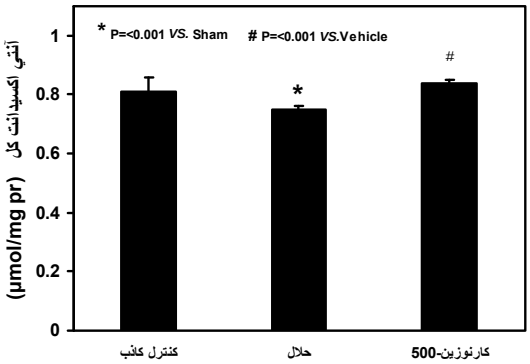
شکل ۵. میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (U/mg Protein) در در گروه های کنترل کاذب (Sham) و حلال (Vehicle) و کارنوزین در دوز ۵۰۰ را بیست و چهار ساعت بعد جراحی یا ایسکمی را نشان میدهد.

میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در بافت ایسکمیک مغز بیست و چهار ساعت بعد از جراحی در گروه کنترل کاذب ۹/۰۸±۰/۰۶ U/mg Protein بود، ایجاد ایسکمی مغزی باعث کاهش معنی‌داری فعالیت بافتی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (۷/۷۸±۰/۳۱ U/mg Protein) شد(P≤۰/۰۰۱). تزریق کارنوزین با دوز ۵۰۰ mg/kg در شروع ایسکمی باعث افزایش معنی‌دار فعالیت بافتی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (۹/۴۶±۰/۲۷ U/mg Protein) شد (شکل۶، P≤۰/۰۰۱).

مقدار آنتی‌اکسیدانت کل(Total antioxidant) در بافت ایسکمیک مغز در گروه کنترل کاذب (۰/۸۰±۰/۰۰۵ µ/mol/mg Protein) بود. ایجاد ایسکمی مغزی باعث کاهش معنی‌داری مقدار آنتی‌اکسیدانت کل در بافت ایسکمیک مغز (۰/۷۵±۰/۰۱ µ/mol/mg Protein) شد (P≤۰/۰۰۱). درمان با کارنوزین با دوز ۵۰۰ mg/kg، مقدار آنتی‌اکسیدانت کل (۰/۸۴±۰/۰۰۶ µ/mol/mg Protein) را به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه حلال افزایش داد (شکل ۷،P≤۰/۰۰۱).



شکل ۶. میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسیداز دیسموتاز(U/mg Protein)) در گروه های کنترل کاذب (Sham) و حلال (Vehicle) و کارنوزین در دوز 500 mg/kg را بیست و چهار ساعت بعد جراحی یا ایسکمی را نشان میدهد.



شکل ۷. میزان آنتی اکسیدانت کل µmol/mg Protein)) در گروه های کنترل کاذب (Sham) و حلال (Vehicle) و کارنوزین در دوز 500 mg/kg را بیست و چهار ساعت بعد جراحی یا ایسکمی را نشان میدهد.

بحث و نتیجه‌گیری

یافته اصلی این مطالعه نشان داد، کارنوزین خیز مغزی را حدود ۴۰٪ در موش‌های صحرایی که دچار سکته مغزی شده بودند را در مقایسه با گروه شاهد کاهش داد. به نظر می‌آید، این اثرات کارنوزین احتمالاً از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت اندوژن، مهار تولید رادیکال‌های آزاد و تضعیف اکسیداتیو استرس اعمال شده است. این یافته از آن

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2023-03-22]

جهت اهمیت دارد که بدانیم، خیز مغزی از عوارض مهم و تهدیدکننده زندگی بیماران در فاز حاد سکته‌های مغزی است [۲].

بر اساس بررسی مقالات منتشر شده تا حال حاضر، این مطالعه برای اولین بار نشان داد، کارنوزین اثرات محافظتی در مقابل خیز مغزی در مدل تجربی سکته مغزی دارد. در تایید این یافته شواهدی غیر مستقیم وجود دارد که نشان می‌دهد، کارنوزین اثرات ضد خیزی در سطح سلولی در برش‌های تهیه‌شده از کورتکس بویایی موش‌های صحرایی هیپرتانسیو که در معرض ایسکمی از طریق ایجاد خون‌ریزی مغزی بودند، دارد [۲۲].

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت از قبیل SOD و GPXنقش مهمی در کاهش اکسیداتیو استرس دارند [۲۳]. نتایج این مطالعه نشان داد، کارنوزین میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اندوژن SOD, GPX را افزایش داد. هم‌چنین یافته دیگر این پژوهش نشان داد، کارنوزین ظرفیت آنتی‌اکسیدانت کل بافت مغز را هم پس از ایسکمی تقویت می‌نماید. این یافته احتمالاً بیانگر آن است که کارنوزین فعالیت آنتی‌اکسیدانت آنزیمی و غیر آنزیمی را در بافت مغز تقویت می‌نماید و از این طرق باعث تضعیف آسیب‌های اکسیداتیو استرس و کاهش خیز مغزی می‌شود. به طور کلی نظر می‌آید، کارنوزین مکانیسم‌های دفاعی در مقابل رادیکال‌های آزاد را از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD, GPX تقویت نموده و از این طریق توانسته است آسیب‌های ناشی از اکسیداتیو استرس را از جمله خیز مغزی حاصل از سکته مغزی را کاهش دهد. علت افزایش و حفظ سطح فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز ممکن است مربوط به افزایش بیان سنتز آن‌ها و یا کاهش اکسیداسیون این آنزیم‌ها به‌وسیله کارنوزین در مطالعه حاضر باشد.

هم‌چنین نتایج دیگر این تحقیق نشان داد، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت هم‌راه با کاهش تولید مالون‌دی‌آلدئید است. این یافته بیانگر آن است احتمالاً کارنوزین باعث تضعیف آسیب اکسیداتیو استرس در نرون‌های آسیب‌دیده پس از سکته مغزی شده است. مالون‌دی‌آلدئید محصول تجزیه چربی‌های غیر اشباع غشائ سلول به‌وسیله Reactive oxygen species (ROS) است [۲۴]. این ماده شیمیایی به‌عنوان یک شاخص بیوشیمیایی مهم جهت اندازه‌گیری سطح اکسیداتیو استرس در مطالعات استفاده می‌شود [۲۴]. اکسیداتیو استرس نتیجه افزایش تولید ROS و کاهش کارایی مکانیسم دفاعی(آنزیم‌های SOD, GPX و...) در مقابل اکسیدانت‌ها است [۲۵،۲۴]. خیز مغزی در طول ایسکمی مغزی و به‌خصوص برقراری مجدد جریان خون، نتیجه افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و کاهش کارایی مکانیسم‌های دفاعی مثل آنزیم‌های SOD, GPX است [۲۵]. اکسیداتیو استرس از طریق فعال کردن مسیرهای سیگنالینگ آسیب‌رسان مختلف منجر به شکسته شدن سد خونی مغزی، تشکیل خیز و فعال کردن مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی شده و نهایتاً سبب مرگ نرونی و افزایش آسیب پس از سکته مغزی می‌شود [۲۷،۲۶]. بنابراین به نظر می‌آید حداقل بخشی از اثرات ضد خیزی کارنوزین که در این مطالعه مشاهده شده است، نتیجه افزایش فعالیت آنزیم‌های ضد اکسیدانتی اندوژن و مهار مسیرهای اکسیداتیو استرس باشد. در تایید این یافته چندین پژوهش نشان داده‌اند، کارنوزین باعث تضعیف اکسیداتیو استرس در مدل‌های مختلف سکته‌های مغزی در حیوانات آزمایشگاهی می‌شود [۱۵،۱۰،۹].

شواهد پژوهشی نشان داده‌اند، بعد از مرحله حاد ایسکمی مغزی، کارنوزین می‌تواند از سد خونی مغزی عبور نموده و وارد مغز شود [۲۸]. بنابراین، در مطالعه حاضر کارنوزین تجویز شده وارد مغز شده و نقش محافظتی در مقابل خیز مغزی اعمال نموده است.

نتایج پژوهشی که به تازگی منتشر شده است، نشان داد کارنوزین تا ۹ ساعت پس از ایسکمی می‌تواند آسیب ناشی سکته مغزی را در موش صحرایی به‌طور قابل توجهی کاهش می‌دهد [۳]. از پیشنهادات جالب پژوهش اخیر [۳] معرفی کارنوزین به‌عنوان کاندید درمانی بسیار جالب برای درمان بیماران سکته مغزی در آینده است و همین طور تاکید شد

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2023-03-22]

جهت تکمیل مطالعات اثرات این دارو بر خیز مغزی نیز مورد پژوهش قرار گیرد. نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر تایید بیش‌تری بر کارایی و استفاده کانوزین به‌عنوان یک داروی موثر در بیماران سکته مغزی است.

پژوهش‌های اخیر ما و دیگران نشان داده‌اند، TNF-α (فاکتور نکروزدهنده تومووری-آلفا) به‌عنوان یک فاکتور پیش‌التهابی نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی خیز پس سکته مغزی دارد [۲۹،۱۷]. مشاهدات قبلی گزارش نموده‌اند، کارنوزین اثرات ضدالتهابی دارد و می‌تواند برخی سیتوکین‌های پیش‌التهابی را مثلTNF-α را مهار نماید [۷]. اگرچه در این پژوهش میزان بیانTNF-α اندازه‌گیری نشده است، و جزء اهداف این مطالعه هم نبود. اما بر اساس شواهد موجود [۷] ممکن است بخشی از اثرات ضد خیزی کارنوزین که در این مطالعه مشاهد شد، مربوط به اثرات آن در تضعیف TNF-α باشد. جهت روشن شدن و تایید این گمان نیاز به مطالعه بیش‌تری است.

نتایج این پژوهش نشان داد، کارنوزین اثر محافظتی در مقابل خیز مغزی در مدل تجربی سکته مغزی دارد. حداقل بخشی از این اثر احتمالاً از طریق تضعیف مسیرهای آسیب‌رسان اکسیداتیو استرس باشد. نتایج مطالعه حاضر و پژوهش‌های قبلی [۱۱-۹،۳] بیانگر آن است که، کارنوزین احتمالاً می‌تواند به‌عنوان داروی موثر در کاهش خیز و یا درمان آسیب‌های مغزی در بیماران سکته مغزی کاربرد داشته باشد. پیشنهاد می‌شود، بعد از مطالعات تکمیلی فارماکولوژیکی در سطح مولکولی و حیوانی اثر درمانی این دارو در کلینیک و بیماران سکته مغزی مورد تحقیق و پژوهش قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی سمنان انجام شد. این مقاله از پایان‌نامه آقای سعید بیاتی و خانم رویا حسن‌زاده دانشجویان پزشکی استخراج شده است. نویسندگان مقالهاز همکاری و مساعدت خانم‌ها شقایق شریفات و مریم حدادها از دانشجویان کارشناسی ارشد فیزیولوژی دانشکده پزشکی و آقای دکتر علی رشیدی‌پور ریاست محترم مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی سمنان قدردانی و تشکر می‌نمایند.

منابع

[1] Marmarou A. Pathophysiology of traumatic brain edema: current concepts. ActaNeurochirSuppl 2003; 86:7-10.

[2] Rosand J, Schwamm LH. Management of brain edema complicating stroke. J Intensive Care Med 2001; 16:128-141.

[3] Bae ON, Serfozo K, Baek SH, Lee KY, Dorrance A, Rumbeiha W, et al. Safety and efficacy evaluation of carnosine, an endogenous neuroprotective agent for ischemic stroke. Stroke 2013; 44:205-212.

[4] Vakili A, Hosseinzadeh S.A. Zahedikhorasani M. Effect of central microinjection of carbenoxolone in an experimental model of focal cerebral ischemia. Pak. J. Pharm. Sci., 2009;22: 349-354.

[5] Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms, challenges, and oppor¬tunities in stroke. Nat Rev Neurosci 2003; 4: 399-414.

[6] Green AR, Shuaib A. Therapeutic strategies for the treatment of stroke. Drug Discov Today 2006; 11:681-693.

[7] Bellia F, Vecchio G, Cuzzocrea S, Calabrese V, Rizzarelli E. Neuroprotective features of carnosine in oxidative driven diseases. Mol Aspects Med 2011; 32: 258-266.

[8] Bauer K. Carnosine and homocarnosine, the forgotten, enigmatic peptides of the brain. Neurochem Res 2005; 30: 1339-1345.

[9] Shen Y, He P, Fan YY, Zhang JX, Yan HJ, Hu WW, et al. Carnosine protects against permanent cerebral ischemia in histidine decarboxylase knockout mice by reducing glutamate excitotoxicity. Free RadicBiol Med 2010; 48: 727-735.

[10] Zhang X, Song L, Cheng X, Yang Y, Luan B, Jia L, et al. Carnosine pretreatment protects against hypoxia-ischemia brain damage in the neonatal rat model. Eur J Pharmacol 2011; 667: 202-207.

[11] Wang JP, Yang ZT, Liu C, He YH, Zhao SS. L-carnosine inhibits neuronal cell apoptosis through signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway after acute focal cerebral ischemia. Brain Res 2013; 1507:125-133.

[12] Hipkiss AR. Carnosine and its possible roles in nutrition and health. Adv Food Nutr Res 2009; 57: 87-154.

[13] Rajanikant GK, Zemke D, Senut MC, Frenkel MB, Chen AF, Gupta R, Majid A. Carnosine is neuroprotective against permanent focal cerebral ischemia in mice. Stroke 2007; 38:3023-3031.

[14] Dobrota D, Fedorova T, Stvolinsky S, Babusikova E, Likavcanova K, Drgova A, et al. Carnosine protects the brain of rats and Mongolian gerbils against ischemic injury: after-stroke-effect. Neurochem Res 2005; 30: 1283-1288.

[15] Pekcetin C, Kiray M, Ergur BU, Tugyan K, Bagriyanik HA, Erbil G, et al. Carnosine attenuates oxidative stress and apoptosis in transient cerebral ischemia in rats. ActaBiol Hung 2009; 60:137-148.

[16] Vakili A, Nekoeian AA, Dehghani GA: L-NAME and 7-Nitroinidazole reduces brain injury in rat model of transient focal cerebral ischemia. Iran J Med Sci. 2004, 29: 109-114.

[17] Vakili A, Mojarad S, Akhavan MM, Rashidy-pour A. Pentoxifylline attenuates TNF-α protein levels and brain edema following temporary focal cerebral ischemia in rats. Brain Res 2011; 1377: 119-125.

[18] Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Müller C, Kluge A, Bachmann A, et al. Noninvasive quantification of brain edema and the space-occupying effect in rat stroke models using magnetic resonance imaging. Stroke 2004; 35:566-571.

[19] Vakili A, Einali MR, Bandegi AR. Protective Effect of Crocin against Cerebral Ischemia in a Dose-Dependent Manner in a Rat Model of Ischemic Stroke. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2014;3:106-113.

[20] Vakili A, Eianali MR, Bandegi AR. The protective effects of Saffron against the oxidative damage in a transient model of

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2023-03-22]

focal cerebral ischemia in rats. Tehran Univ Med J 2011; 69: 405-412. (Persian).

[21] Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999; 299:15-27.

[22] Khama-MuradAKh, Mokrushin AA, Pavlinova LI. Neuroprotective properties of l-carnosine in the brain slices exposed to autoblood in the hemorrhagic stroke model in vitro. RegulPept 2011; 167:65-69.

[23] Allen CL, Bayraktutan U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis ofischaemic stroke. Int J Stroke 2009; 4:461-470.

[24] Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. Free RadicBiol Med 1990; 9: 515-540.

[25] Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. J Cereb Blood Flow Metab 2001; 21:2-14.

[26] Heo JH, Han SW, Lee SK. Free radicals as triggers of brain edema formationafter stroke. Free RadicBiol Med 2005; 39: 51-70.

[27] Kontos HA. Oxygen radicals in cerebral ischemia: the 2001 Willislecture. Stroke 2001; 32: 2712-2716.

[28] Dziennis S, Alkayed NJ. Role of signal transducer and activator of transcription 3 in neuronal survival and regeneration. Rev Neurosci 2008; 19:341-361.

[29] Han T. Effects of salidroside pretreatment on expression of tumor necrosis factor-alpha and permeability of blood brain barrier in rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion injury. Asian Pac J Trop Med 2013; 6:156-158.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2023-03-22]

Effect of carnosine on cerebral edema and oxidative stress biomarkers in a transient model of focal cerebral ischemia in rats

Abedin Vakili (Ph.D)[*1], Ahmad Reza Bandegi (Ph.D)[2], Saeed Baiati (M.D)[1], Roya Hassanzadeh (M.D)[1], Yasin Asadi (M.Sc)[1]

1 - Laboratory of Cerebrovascular, Research, Research Center and Department of Physiology, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

2 – Dept. of Biochemistry, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

(Received: 21 Jul 2013; Accepted: 16 Dec 2013)

Introduction: Carnosine is an endogenous dipeptide expressed in many tissues including brain and has a protective effect against ischemic brain damage. However, its effect on brain edema, which is one of the most important variables in determining the amount of secondary brain damage after stroke, is not clear. The present study was conducted to investigate the effect of L-Carnosine on brain edema and oxidative stressbiomarkers in an experimental model of focal cerebral ischemia.

Materials and Methods: Under Laser Doppler flowmetry, cerebral ischemia was induced by transient occlusion of middle cerebral artery for 1 hour in rats. L-Carnosine at doses of 250 and 500 mg/kg.ip was injected immediately after induction of ischemia. Cerebral edema and enzymes activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and malondialdehyde (MDA) content were measured 24 hours after ischemia using a standard method and kit.

***Results*:** Administration of L-Carnosine at doses 250(%81.5±0.36) and 500 (%80.9±0.30) mg/kg significantly reduced brain edema by 25% and 40% in comparison with the control group (%82.53±0.16), respectively (P<0.001). Additionally, treatment with L-Carnosine significantly reduced MDA content and increased activity of SOD, GPx and total antioxidant capacity in the brain ischemic tissue (P< 0.001).

Conclusion: Results showed Carnosine has a protective effect against brain edema in an experimental model of stroke. This is probably due to increase of endogenous antioxidant enzymes, inhibiting free radical generation and attenuating of oxidative stress.

***Keywords*:** Carnosine, Brain Ischemia, Brain edema, Oxidative stress, Rats

*Corresponding author. Fax: +98 23 33354186 Tel: +98 23 33354161

ab.vakili@yahoo.com

How to cite this article:

Vakili A, Bandegi A, Baiati S, Hassanzadeh R, Asadi Y. Effect of carnosine on cerebral edema and oxidative stress biomarkers in a transient model of focal cerebral ischemia in rats. koomesh. 2014; 15 (4) :493-501

URL http://koomeshjournal.semums.ac.ir/browse.php?a_code=A-10-275-3&slc_lang=fa&sid=1

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2023-03-22]