● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست‌ودوم، شمارهٔ ۵ ص ۴۶۹-۴۵۷، ۱۳۹۴

مقالهٔ پژوهشی

بررسی اثر اسید اسکوربیک بر کاهش عوارض ناشی از سکته مغزی مدل بستن دایم شریان مغزی میانی در موش صحرایی نر

فاطمه امین[۱]، امین تقوی رفسنجانی[۲]، علی شمسی‌زاده[۳]، امیر موسایی[۲]، شایان رضایی[۲]، علی حسنی[۲]، سودابه نادری[٤]، صدیقه اسماعیلی[٤]، محمد اله‌توکلی[۳*]

خلاصه

مقدمه: سکته مغزی به عنوان سومین عامل مرگ و میر شناخته می‌شود. از آن‌جا که استرس اکسیداتیو در بروز بسیاری از عوارض سکته مغزی نقشی اساسی دارد و با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسید اسکوربیک، این مطالعه با هدف بررسی اثر اسید اسکوربیک بر کاهش عوارض ناشی از سکته مغزی مدل بستن دایم شریان مغزی میانی در موش‌های صحرایی نر انجام شد.

روش: در مطالعه تجربی حاضر، حیوانات به سه گروه شاهد (حلال)، دریافت کننده اسید اسکوربیک و شم جراحی تقسیم شدند. سکته مغزی از طریق سوزاندن شریان مغزی میانی القا شد. ۴۸ ساعت پس از القای سکته، مغز حیوانات برش داده شد و رنگ‌آمیزی به کمک تترازولیوم کلراید (Tetrazolium chloride یا TTC) صورت گرفت. سپس حجم انفارکتوس به کمک یک نرم‌افزار پردازشگر تصویری اندازه‌گیری شد. همچنین آزمون‌های رفتاری مانند اختلالات نورولوژیک، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از القای ایسکمی بررسی گردید. در نهایت داده‌ها با استفاده از آزمون One-way ANOVA مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته‌ها: حجم انفارکتوس در گروه دریافت کننده اسید اسکوربیک در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۱۰$). همچنین میزان شکست سد خونی- مغزی (Blood-brain barrier یا BBB)، حجم ادم مغزی ($P < ۰/۰۰۱$) و سطح MMP9 (Matrix metallopeptidase-9) ($P < ۰/۰۵۰$) کاهش قابل توجهی را نشان داد. اختلالات نورولوژیک نیز که با سیستم رتبه‌بندی Bederson بررسی شد، در گروه اسید اسکوربیک بهبود نسبی داشت ($P < ۰/۰۵۰$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که اسید اسکوربیک به علت اثرات محافظت نورونی (Neuroprotective) می‌تواند تأثیر قابل ملاحظه‌ای در کاهش عوارض سکته مغزی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: اسید اسکوربیک، محافظت نورونی، سکته مغزی

۱- کارشناس ارشد، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران ۲- دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران ۳- دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران ۴- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: allahtavakoli@gmail.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱/۸ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۳/۸/۲۵ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۹/۱۲

مقدمه

سکته مغزی سومین علت مرگ و میر در جهان و اولین عامل ناتوانی در بزرگسالان می‌باشد (۲، ۱). سکته تنها در ۱۸-۸ درصد موارد ناشی از خونریزی مغزی است و در بقیه موارد به صورت ایسکمیک رخ می‌دهد که در آن جریان خون به علت انسداد عروقی از دست می‌رود (۳). سکته ایسکمیک منجر به فعال‌سازی مجموعه‌ای از فرایندهای پاتولوژیک از جمله ادم مغزی، تخریب سد خونی- مغزی (Blood-brain barrier یا BBB)، ماتریکس متالوپروتئازها، استرس اکسیداتیو و التهاب مغزی می‌شود (۴). استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش رادیکال‌های آزاد در بروز تمامی این فرایندها مؤثر است و در نتیجه به عنوان یک عامل اساسی در ایجاد آسیب مغزی نقش دارد (۷-۵)؛ به طوری که رادیکال‌های آزاد باعث آسیب به سد خونی- مغزی و در نتیجه منجر به ادم وازوژنیک مغز می‌شوند (۶).

به دنبال سکته مغزی و یا قطع جریان خون به قسمتی از مغز، غلظت اکسیژن و مواد متابولیکی به سرعت در نواحی ایسکمیک مغز کاهش می‌یابد و طی چند دقیقه به سطوح غیر قابل تشخیص می‌رسند (۸). کاهش اکسیژن بافتی در ناحیه ایسکمیک مغز، سبب اختلال در عملکرد میتوکندری‌ها و تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود (۹). کاهش فعالیت و ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌ها و افزایش رادیکال‌های آزاد منجر به وارد آمدن آسیب جدی به اجزای تشکیل دهنده سلول مانند لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک و در نهایت باعث مرگ سلولی می‌گردد (۱۰). سلول‌های عصبی واقع در مرکز قطع جریان خون (مرکز ضایعه) در همان دقایق اولیه سکته مغزی از بین می‌روند و آسیب‌های اولیه را ایجاد می‌کنند؛ در حالی که سلول‌هایی که در حاشیه مرکز ضایعه (Penumbra) قرار دارند، زنده مانده و فاقد عملکرد طبیعی می‌شوند و ممکن است در اثر وجود رادیکال‌های آزاد به تدریج از بین رفته، دچار آپوپتوز شوند و آسیب ثانویه پس از سکته مغزی را به وجود آورند (۱۱). برای این سلول‌ها قابلیت بازیابی به وسیله داروهای محافظت کننده نورون (Neuroprotective) متصور شده‌اند (۱۲).

به طور کلی سیستم آنتی‌اکسیدان طبیعی مغز شامل آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز و همچنین مواد غیر آنزیمی مثل اوریک اسید و ویتامین‌های C و E می‌باشد (۱۳). بنابراین یکی از موادی که می‌تواند اثر محافظت کننده نورونی داشته باشد، اسید اسکوربیک است. لازم به ذکر است که این اثر محافظتی و کاهش آسیب‌های مغزی، در مدل بستن شریان مغزی میانی در موش‌ها نیز مشاهده شده است (۱۶-۱۴). همچنین مطالعات آزمایشگاهی نشان داده‌اند که سطح اسکوربات به دنبال ایسکمی مغزی به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد و ایسکمی باعث کاهش شدید غلظت داخل سلولی اسید اسکوربیک و گلوتاتیون احیا (Glutathione یا GSH) می‌شود (۱۶).

با توجه به این‌که افزایش رادیکال‌های آزاد منجر به تولید استرس اکسیداتیو می‌گردد، یکی از راه‌حل‌ها برای کاهش استرس‌های اکسیداتیو، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها جهت کاهش رادیکال‌های آزاد می‌باشد. اسید اسکوربیک که به عنوان ویتامین C نیز شناخته می‌شود، در نقش یک آنتی‌اکسیدان قوی، رادیکال‌ها را جمع‌آوری نموده، بدین ترتیب از آسیب رسیدن به سلول جلوگیری می‌کند (۱۸، ۱۷).

در تحقیقات گذشته اثر آسکوربات بر سکته در پریمات‌ها مورد بررسی قرار گرفته است (۱۹). همچنین این اثر بر سکته القا شده از طریق مدل‌های ایسکمی- ریپرفیوژن نیز مطالعه شده است (۲۰، ۱۵). با توجه به اثرات

مفید اسید اسکوربیک، هدف از این مطالعه بررسی میزان تأثیر اسید اسکوربیک بر کاهش گسترش ضایعه در مدل بستن دایم شریان مغزی میانی (Middle cerebral artery یا MCA) و در شرایط عدم انجام ریپرفیوژن بود.

روش بررسی

حیوانات و درمان: در مطالعه حاضر از ۳۰ موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد (۲۰). در هر قفس ۱۰ عدد موش صحرایی در حیوان‌خانه دانشکده پزشکی رفسنجان تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی و در دمای ۲ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در این مدت حیوانات از نظر دسترسی به آب و غذا محدودیتی نداشتند. حیوانات به طور تصادفی در سه گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. گروه شاهد یا حلال (سرم فیزیولوژی دریافت نمودند): که در آن‌ها سکته مغزی القا شد و حیوانات هیچ دارویی دریافت نکردند؛ گروه شم جراحی: در این گروه تمامی مراحل جراحی انجام شد و شریان مغزی میانی تحت تأثیر قرار گرفت، اما سکته القا نشد و گروه اسید اسکوربیک: در این گروه قبل از ایجاد سکته مغزی، حیوانات توسط کاتتر گاواژ دهانی- معدی تحت درمان با اسید اسکوربیک (۱ گرم بر کیلوگرم) قرار گرفتند.

روش ایجاد ایسکمی مغزی: برای ایجاد سکته مغزی، پس از بیهوش کردن حیوان با کتامین، حیوان به پهلو قرار داده شد و یک برش مورب عمودی ۲ سانتی‌متری در پوست ناحیه وسط اوربیت چپ و کانال شنوایی خارجی زده شد. مراحل بعدی با تکنیک‌های جراحی انجام گرفت؛ بدین ترتیب که پوست اطراف شکاف کنار زده شد و غده پاروتید در یک چهارم پشتی- تحتانی میدان دید مشاهده گردید. منبع عروقی سوزانده و در قطب قدامی- فوقانی خود تقسیم شد و غده به جهت پشتی حرکت داده شد. سپس یک برش در اطراف لبه‌های فوقانی و پشتی عضله تمپورالیس زده شد و با یک بالا برنده عضله، از سمت کناری جمجمه کنار زده و به سمت جلو برگردانده شد. پس از آن بخش اصلی عضله با یک برش عمودی رو به لبه قدامی آن و از ناحیه اتصال آن به نوک زایده کورونوئیدی بریده شد. این استخوان و نیمه پشتی استخوان گونه برداشته و شریان مغزی میانی سوزانده شد. بافت‌های نرم به سمت عقب به جای خود برگردانده و سپس پوست بخیه زده شد (۲۱).

تعیین حجم انفارکتوس: حجم انفارکتوس ۴۸ ساعت بعد از سکته مغزی تعیین شد. برای تعیین حجم انفارکتوس، مغز پس از خارج کردن برش داده شد (برش‌های ۲ میلی‌متری کرونال) و با تترازولیوم کلراید (Tetrazolium chloride یا TTC) رنگ‌آمیزی گردید. برای این منظور پس از تهیه محلول ۲ درصد تترازولیوم کلراید، برش‌های مغز هر حیوان در محلول فوق قرار گرفت و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. ماده TTC با آنزیم‌های دهیدروژناز داخل سلول‌های زنده واکنش نشان داد و به رنگ قرمز در آمد. بنابراین سلول‌های زنده به رنگ قرمز تبدیل شدند، اما نورون‌های مرده تغییر رنگ ندادند (به دلیل نبودن دهیدروژنازها). بعد از ثابت کردن برش‌ها با فرمالین ۱۰ درصد، از آن‌ها توسط اسکنر تصویربرداری گردید و با نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری شدند.

حجم انفارکتوس با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۲۲).

حجم انفارکتوس = [حجم نیم‌کره چپ - (حجم نیم‌کره راست - حجم انفارکتوس اندازه‌گیری شده با TTC)] × ۱۰۰ ÷ حجم نیم‌کره چپ

تعیین میزان ادم مغزی: از پلتیسموگراف جهت تعیین حجم مغزی و از فرمول زیر جهت اندازه‌گیری میزان ادم مغزی استفاده شد (۲۲).

ادم مغزی = [(حجم نیم‌کره راست - حجم نیم‌کره چپ) ÷ حجم نیم‌کره چپ × ۱۰۰]

اندازه‌گیری نفوذپذیری سد خونی- مغزی (شکست سد خونی- مغزی): نفوذپذیری سد خونی- مغزی از طریق نشت رنگ آبی Evans (Evans blue) به عنوان یک معرف نشت آلبومین به صورت کمی تعیین شد. دو ساعت قبل از کشتن حیوان، ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم رنگ آبی Evans ۲ درصد به داخل ورید فمورال تزریق شد. سپس حیوان توسط کتامین بیهوش و خون او از طریق ترانس کاردیاک (تزریق سالین از بطن چپ و خروج خون از دهلیز راست) خارج گردید. پس از آن مغز خارج شد و بعد از جدا کردن دو نیم‌کره، هر یک از آن‌ها به مدت ۲۴ ساعت داخل محلول فرمامید (۱ میلی‌لیتر بر ۱۰۰ میلی‌گرم) ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در پایان غلظت رنگ خارج شده از هر مغز توسط دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۶۲۰ نانومتر مشخص شد (۲۳).

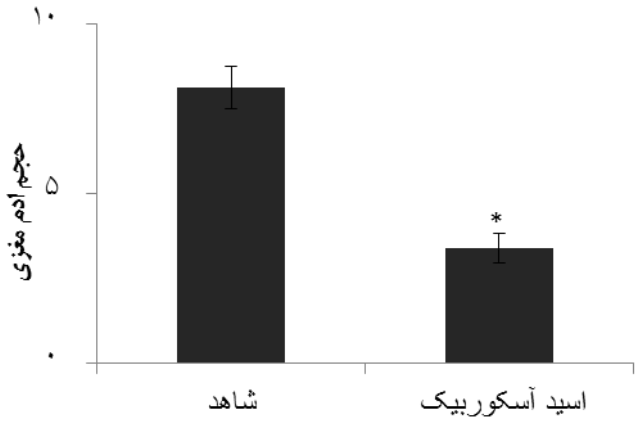
اندازه‌گیری سطح MMP9 (Matrix metallopeptidase-9) به وسیله روش ELISA (Enzyme-Linked immunosorbent assay): برای بررسی میزان فعالیت MMP9 در نمونه‌های خون، از روش ELISA استفاده شد (۷). بدین منظور تمامی نمونه‌ها با کیت‌های تجارتی شرکت R&D Systems (کشور آمریکا) مورد ارزیابی قرار گرفتند و دستورالعمل مربوط به آن به صورت زیر اجرا شد. اندازه‌گیری MMP9 در این کیت‌ها بر اساس روش ساندویچ بود؛ به گونه‌ای که آنتی‌بادی موجود در کیت با آنتی‌بادی موجود در سرم، برای اتصال به MMP9 کد شده در پلیت‌ها رقابت می‌کند. چاهک‌های مورد نیاز برای بررسی نمونه‌ها به همراه دو نمونه شاهد منفی و شاهد مثبت آماده شدند. ۵۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده و ۵۰ میکرولیتر از هر استاندارد و نمونه نیز به هر ویال مخصوص اضافه شد. با حرکت دورانی پلیت‌ها، مواد موجود در چاهک‌ها مخلوط و درب پلیت‌ها با چسب بسته شد و به مدت ۱۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. بعد از شستشوی ویال‌ها با بافر شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی کونژوگه به آنزیم HRP (Horseradish peroxidase) در هر ویال اضافه و به مدت ۱۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. محتوی چاهک‌ها تخلیه و پنج مرتبه با محلول شستشوی آماده شده در غلظت مناسب شستشو گردید. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا به هر ویال اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شد. ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (H2SO42N) به هر ویال اضافه گردید. در نهایت، پلیت‌ها توسط دستگاه ELISA reader و در طول موج ۴۵۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند.

آزمون رفتاری Bederson: اختلالات نورولوژیک توسط سیستم رتبه‌بندی Bederson، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد نمره‌دهی شد که شامل عدم هرگونه اختلال = ۰، خم شدن اندام جلویی = ۱، خم شدن اندام جلویی به اضافه کنترل مقاومت در هل دادن جانبی = ۲، چرخیدن به یک طرف = ۳، چرخیدن به یک طرف به اضافه کاهش سطح هوشیاری = ۴ و مردن و یا عدم هوشیاری و تحرک = نمره ۵ بود (۶).

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) استفاده شد. تفاوت‌های حجم انفارکتوس، ادم مغزی، نشت رنگ آبی Evans، غلظت MMP9 و اختلالات رفتاری توسط آزمون One-Way ANOVA و پس‌آزمون Tukey محاسبه و به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش گردید.

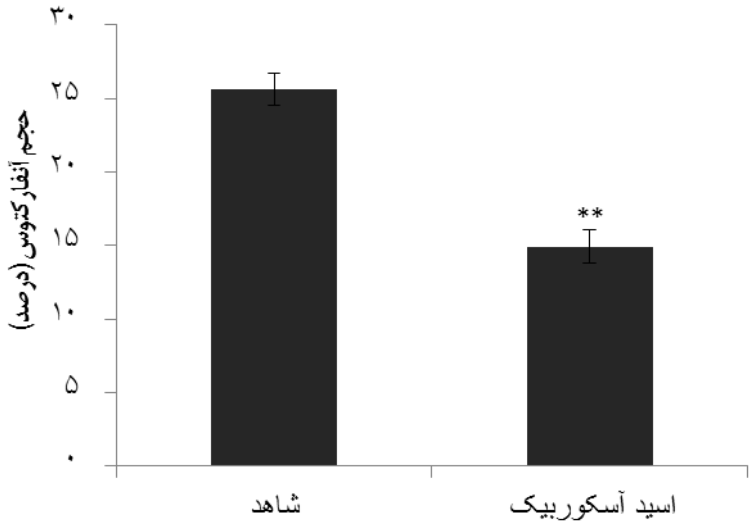
نتایج

هیچ گونه ادم، انفارکتوس و اختلالات نورولوژیک در گروه شم جراحی مشاهده نشد. میانگین ادم مغزی ۴۸ ساعت پس از جراحی در گروه شاهد (۰/۶۳ ± ۸/۱۱ درصد) بیشتر از گروه دریافت کننده اسید اسکوربیک (۰/۴۲ ± ۳/۳۷ درصد) بود که اختلاف معنی‌داری بین دو گروه وجود داشت (P < ۰/۰۰۱) (شکل ۱).



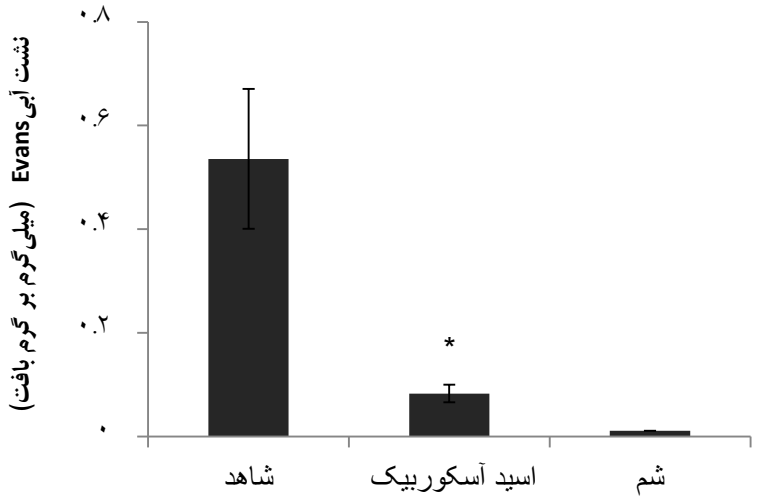
شکل ۱. *مقایسه حجم ادم در گروه دریافت کننده اسید اسکوربیک با گروه شاهد (تعداد در هر گروه = ۱۰ سر موش)*
$P < ۰/۰۰۱^{*}$

میانگین حجم انفارکتوس پس از سکته در گروه دریافت کننده اسید اسکوربیک (۱/۱۲ ± ۱۴/۹۲ درصد) نسبت به گروه شاهد (۱/۱۱ ± ۲۷/۵۹ درصد) کاهش معنی‌داری را نشان داد (P < ۰/۰۱۰) (شکل ۲).



شکل ۲. *مقایسه حجم انفارکتوس در گروه دریافت کننده اسید اسکوربیک با گروه شاهد (تعداد در هر گروه = ۱۰ سر موش)*
$P < ۰/۰۱۰^{**}$

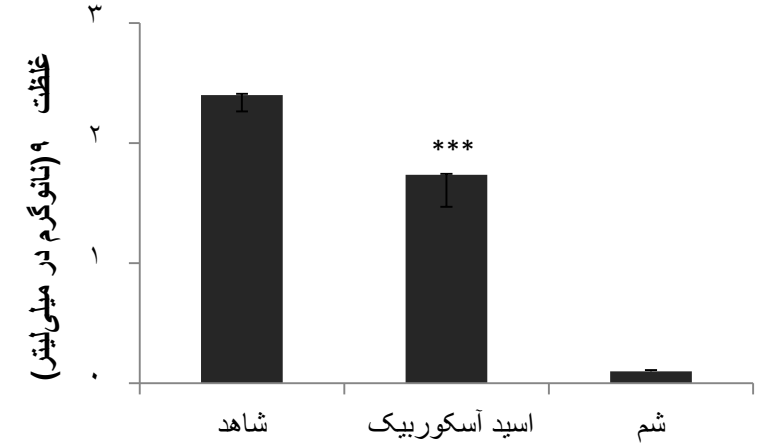
از طرف دیگر، گروه دریافت کننده اسید اسکوربیک اختلاف معنی‌دار میزان نشت رنگ آبی Evans را نسبت به گروه شاهد نشان داد ($P < ۰/۰۰۱$). میانگین میزان نشت رنگ آبی Evans پس از سکته در گروه شاهد (۰/۱۳ ± ۰/۵۳ میلی‌گرم بر گرم بافت) بیشتر از گروه دریافت کننده اسید اسکوربیک (۰/۰۲ ± ۰/۰۸ میلی‌گرم بر گرم بافت) بود (شکل ۳).



شکل ۳. *مقایسه نشت رنگ آبی Evans در گروه دریافت‌کننده اسید اسکوربیک با گروه شاهد و شم جراحی (تعداد در هر گروه = ۱۰ سر موش)*

$P < ۰/۰۰۱^{*}$

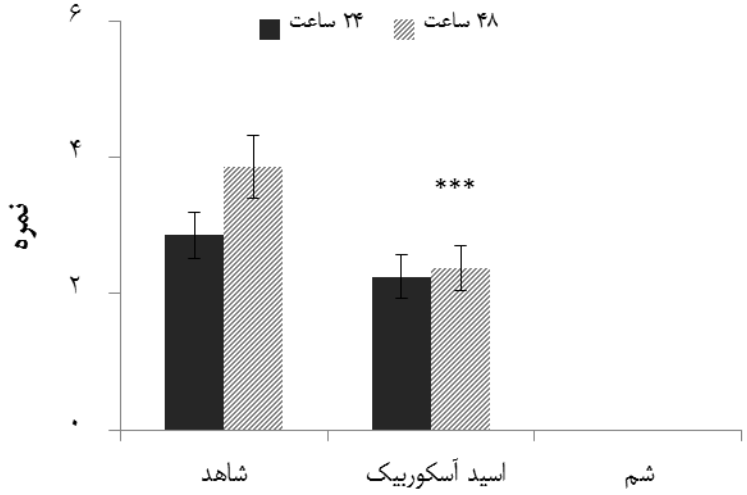
همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، یکی دیگر از یافته‌های پژوهش حاضر، کاهش معنی‌دار میزان MMP9 بود ($P < ۰/۰۵۰$). میانگین میزان MMP9 پس از سکته در گروه شاهد (۰/۱۳ ± ۲/۴ نانوگرم در میلی‌لیتر) نسبت به گروه دریافت کننده اسید اسکوربیک (۰/۲۶ ± ۱/۷۳ نانوگرم در میلی‌لیتر) افزایش داشت.



شکل ٤. *مقایسه میزان MMP9 (Matrix metallopeptidase-9) در گروه دریافت کننده اسید اسکوربیک با گروه شاهد و شم جراحی (تعداد در هر گروه = ۱۰ سر موش)*

$P < ۰/۰۵۰^{***}$

اثر اسید اسکوربیک بر اختلالات نورولوژیک بر حسب سیستم رتبه‌بندی Bederson، ۲۴ ساعت پس از سکته در گروه شاهد برابر با ۰/۳۴ ± ۲/۸۵ و در گروه دریافت کننده اسید اسکوربیک، ۰/۳۱ ± ۲/۲۵ بود. این میزان ۴۸ ساعت پس از سکته در گروه شاهد، ۰/۴۶ ± ۳/۸۵ و در گروه دریافت کننده اسید اسکوربیک، ۰/۳۲ ± ۲/۳۷ بود (شکل ۵) که نشان دهنده کاهش معنی‌دار میزان اختلالات نورولوژیک گروه دریافت کننده اسید اسکوربیک نسبت به گروه شاهد در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از سکته می‌باشد ($P < ۰/۰۵۰$).



شکل ۵: *مقایسه نمره حاصل از رتبه‌بندی Bederson در گروه دریافت‌کننده اسید اسکوربیک با گروه شاهد و شم جراحی (تعداد در هر گروه = ۱۰ سر موش)*

$P < ۰/۰۵۰^{***}$

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تجویز خوراکی اسید اسکوربیک به طور معنی‌داری در کاهش حجم انفارکتوس و بهبود اختلالات رفتاری نقش مهمی دارد. همچنین سطح MMP9 و میزان تخریب سد خونی- مغزی و ادم مغزی در گروه‌های دریافت کننده اسید اسکوربیک به طور چشمگیری کاهش یافته بود.

نتایج مطالعه Berneur و همکاران حاکی از آن بود که استفاده از اسید اسکوربیک می‌تواند سبب افزایش میزان بیان ژن آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در مدل‌های ایسکمیک موش‌های هیپرگلیسمیک شود. با توجه به این‌که آنزیم سوپراکسید دیسموتاز یکی از قوی‌ترین آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشد، قادر است با خنثی کردن رادیکال‌های آزاد از آسیب‌های نورونی و شکست سد خونی- مغزی جلوگیری کند و از میزان ادم مغزی بکاهد (۲۴) که این مسأله به روشنی در مطالعه حاضر تأیید گردید. در گروه دریافت کننده اسید اسکوربیک به طور مؤثری از ادم مغزی جلوگیری شد و حجم انفارکتوس نیز کاهش یافت. یافته‌ها نشان داد که در اثر کاهش ادم مغزی، میزان اختلالات نورولوژیک نیز در گروه‌ها کاهش می‌یابد. پس در پژوهش حاضر ثابت شد که اسید اسکوربیک قادر است از عوارض سکته مغزی مانند ادم مغزی و انفارکتوس مغزی جلوگیری کند.

مطالعات متعددی بر تأثیر ویتامین C (اسید اسکوربیک) و ویتامین E بر افزایش فعالیت آنزیم مهار کننده tPA (Tissue-type plasminogen activator) با نام کامل plasminogen activator inhibitor-1 یا PAI-1، تأکید کرده‌اند که بیشتر آن‌ها در مدل‌های سکته قلبی خوکچه هندی انجام شده است و نشان می‌دهد که tPA درونی ترشح شده پس از سکته مغزی، در شرایط مختلف باعث افزایش MMP9 می‌شود. ویتامین‌های آنتی‌اکسیدان مانند ویتامین C و ویتامین E با فعال کردن PAI-1، باعث مهار tPA می‌شوند و در نتیجه از افزایش MMP9 جلوگیری می کنند (۲۷-۲۵). با توجه به این که میزان رادیکال های آزاد (۲۸) و مقدار آنزیم MMP9 در سکته مغزی افزایش می‌یابد (۲۹) و این امر باعث افزایش نفوذپذیری سد خونی- مغزی می گردد (۲۹)، آنتی‌اکسیدان‌ها ازجمله ویتامین C می‌توانند با خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و به دام انداختن آن‌ها و مهار فعالیت آنزیم MMP9، به صورت غیر مستقیم سبب کاهش نفوذپذیری سد خونی- مغزی شوند. از طرف دیگر، این آنتی اکسیدان ها با مهار رادیکال های آزاد از آسیب مستقیم به سد خونی- مغزی و افزایش نفوذپذیری آن جلوگیری می کنند. در مطالعات اخیر که به بررسی پاتوفیزیولوژی این واقعه پرداخته‌اند، نقش استرس اکسیداتیو و التهاب در گسترش آسیب ناشی از ایسکمی مغزی و ریپرفیوژن به وضوح مشخص شده است (۳۳-۳۰).

در مطالعه حاضر میزان ادم مغزی در گروه دریافت کننده اسید اسکوربیک به طور معنی داری نسبت به گروه شاهد کمتر بود. اسید اسکوربیک از طریق کاهش میزان MMP9 و همچنین کاهش رادیکال های آزاد حاصل از ایسکمی، سبب کاهش ادم مغزی می‌شود. بنابراین فرض تحقیق حاضر در مؤثر بودن اسید اسکوربیک و کاهش عوارض حاصل از سکته مغزی صحیح بود. در تبیین این موضوع می‌توان به مولکول التهابی NF-Kβ (Nuclear factor-κB) اشاره کرد که یکی از اصلی‌ترین اهداف داخل سلولی استرس‌های اکسیداتیو می‌باشد. این مولکول به وسیله تعداد زیادی از فاکتورها از جمله هیپرگلیسمی، اسیدهای چرب آزاد، استرس‌های اکسیداتیو و سیتوکین‌های التهابی فعال می گردد. بیان بیش از حد NF-Kβ در بعضی از بیماری‌های مزمن مانند دیابت و تصلب شرایین (Atherosclerosis) مشاهده می‌شود. یافته‌های اخیر در مورد شناسایی و بررسی مولکول‌های هدف جدید برای عمل آنتی‌اکسیدان‌ها نشان داده است که این آنتی‌اکسیدان‌ها قادر هستند مسیر NF-κβ را مهار کنند. مولکول NF-κβ علاوه بر تأثیر بر سایر فاکتورهای التهابی، قادر است باعث افزایش MMP9 شود (۳۴). آنتی‌اکسیدان‌هایی همچون اسید اسکوربیک با مهار این مسیر، از تولید بیشتر MMP9 جلوگیری می کنند.

مطالعه‌ای نشان داد که تجویز روزانه اسید اسکوربیک در پریمات‌ها منجر به کاهش ۵۰ درصدی حجم انفارکتوس در مقایسه با گروه شاهد شد (۱۹). همچنین الهتوکلی و همکاران نقش درمانی اسکوربات در سکته مغزی را در مدل ایسکمی- ریپرفیوژن نشان دادند (۲۰). مطالعه‌ای بر روی موش‌ها گزارش کرد که استفاده از دهیدرواسکوربیک اسید (Dehydroascorbic acid یا DHA) حجم انفارکتوس را کاهش می‌دهد، اما در گروه مشابهی که اسید اسکوربیک دریافت کرده بودند، چنین نتیجه‌ای مشاهده نشد (۱۵).

در پژوهش حاضر از سه دوز ۴۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسید اسکوربیک و DHA استفاده شد. برخلاف DHA، هیچ کدام از دوزهای اسید اسکوربیک اثرات درمانی نداشتند، اما بهبودهای قابل توجهی در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد. در توجیه این پدیده می‌توان به سرعت بالای انتقال DHA از سد خونی- مغزی اشاره کرد (۳۵)، اما بر عکس در مورد اسید اسکوربیک این انتقال به

کندی صورت می‌گیرد (۳۶، ۳۵). از آن‌جایی که انتقال فوری اسید اسکوربیک در طی سکته شاید تنها از محل ضایعه (به دلیل شکست سد خونی- مغزی) امکان‌پذیر باشد، بنابراین استفاده از دوز بالاتر منطقی به نظر می‌رسد. همچنین لازم به ذکر است که دوزهای بالای اسید اسکوربیک اثرات توکسیک DHA را بر سلول‌های ترشح کننده انسولین ندارد (۳۷). این مسأله می‌تواند اثر بالقوه عوامل آنتی‌اکسیدانی را در درمان نشان دهد. هرچند که استفاده Post-ischemic آنتی‌اکسیدان‌های مختلف در بالین طیف گسترده‌ای از نتایج را به همراه داشت (۴۰-۳۸)، اما تجویز اسید اسکوربیک که یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های سیستم عصبی مرکزی (central nervous system یا CNS) است، در بسیاری از مطالعات چه بر روی موش‌ها و چه پریمات‌ها، کاهش معنی‌دار حجم انفارکتوس را در پی داشت (۴۱، ۱۵).

در مطالعات پیشین اثر اسکوربات بر کاهش آسیب اکسیداتیو در مدل ایسکمی- ریپرفیوژن موش‌ها نشان داده شده است (۱۴). از آن‌جا که ریپرفیوژن عامل مهم آزادسازی رادیکال‌های آزاد می‌باشد، این مسأله مشخص نشد که آیا اسکوربات در ایسکمی مغزی و در حالتی که ریپرفیوژن رخ ندهد، باز هم می‌تواند اثر محافظت نورونی داشته باشد؟ در مطالعه حاضر از مدل پایدار (Permanent) برای القای سکته استفاده شد و بنابراین ریپرفیوژن رخ نداد. از آن‌جایی که نتایج به دست آمده نشان دهنده بهبود نسبی ناشی از استفاده از اسکوربات است و با توجه به این‌که یکی از مهم‌ترین اعمال آن، جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد می‌باشد، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که شاید خود ایسکمی به تنهایی نیز باعث آزاد شدن مقادیر قابل توجهی رادیکال آزاد شود و بنابراین اسید اسکوربیک به تنهایی می‌تواند در درمان ایسکمی مغزی نقش بسزایی داشته باشد، اما این که چه میزان از اثربخشی اسید اسکوربیک ناشی از پتانسیل آنتی‌اکسیدانی آن و چه میزان ناشی از سایر قابلیت‌های محافظت نورونی آن می‌باشد، هنوز مشخص نشده است و انجام مطالعات بیشتر جهت تمایز این امر ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری

از مطالعه حاضر چنین استنباط می‌شود که عوامل آنتی‌اکسیدانی (مانند اسید اسکوربیک) می‌تواند در درمان و کاهش عوارض سکته مغزی نقش قابل توجهی داشته باشد و بدین‌وسیله از بروز خسارت‌های فراوان جانی و مالی ناشی از سکته به جامعه انسانی کاست. هرچند انجام پژوهش‌های بیشتر در این زمینه لازم است.

سپاسگزاری

مقاله حاضر حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۹/۲۳۲۹ مصوب تاریخ ۱۳۹۲/۷/۳۰ است که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان انجام شد. بدین‌وسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را ابراز می‌دارند.

References

1. Strong K, Mathers C, Bonita R. Preventing stroke: saving lives around the world. *Lancet Neurol* 2007; 6(2): 182-7.
2. Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Barker-Collo SL, Parag V. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. *Lancet Neurol* 2009; 8(4): 355-69.
3. Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Anderson CS. Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century. *Lancet Neurol* 2003; 2(1): 43-53.
4. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999; 22(9): 391-7.
5. Lewen A, Matz P, Chan PH. Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma* 2000; 17(10): 871-90.
6. Heo JH, Han SW, Lee SK. Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free Radic Biol Med* 2005; 39(1): 51-70.
7. Schmidley JW. Free radicals in central nervous system ischemia. *Stroke* 1990; 21(7): 1086-90.
8. Faraji F, Ranjbar A, Eshrati B, Talaie A, Shafie N, Pirasteh S. Comparing the oxidative stress indexes of CVA patients with control group. *J Arak Univ Med Sci* 2008; 11(3): 109-16. [In Persian].
9. Wilson JX. Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 1997; 75(10-11): 1149-63.
10. Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21(1): 2-14.
11. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 2008; 55(3): 310-8.
12. Segura T, Calleja S, Jordan J. Recommendations and treatment strategies for the management of acute ischemic stroke. *Expert Opin Pharma*cother 2008; 9(7): 1071-85.
13. Wang CX, Shuaib A. Neuroprotective effects of free radical scavengers in stroke. *Drugs Aging* 2007; 24(7): 537-46.
14. Zamani M, Soleimani M, Golab F, Mohamadzadeh F, Mehdizadeh M, Katebi M. Neuro protective effects of adenosine receptor agonist coadministration with ascorbic acid on CA1 hippocampus in a mouse model of ischemia reperfusion injury. *Metab Brain Dis* 2013; 28(3): 367-74.
15. Huang J, Agus DB, Winfree CJ, Kiss S, Mack WJ, McTaggart RA, et al. Dehydroascorbic acid, a blood-brain barrier transportable form of vitamin C, mediates potent cerebroprotection in experimental stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(20): 11720-4.
16. Mack WJ, Mocco J, Ducruet AF, Laufer I, King RG, Zhang Y, et al. A cerebroprotective dose of intravenous citrate/sorbitol-stabilized dehydroascorbic acid is correlated with increased cerebral ascorbic acid and inhibited lipid peroxidation after murine reperfused stroke. *Neurosurgery* 2006; 59(2): 383-8.
17. Cherubini A, Polidori MC, Bregnocchi M, Pezzuto S, Cecchetti R, Ingegni T, et al. Antioxidant profile and early outcome in stroke patients. *Stroke* 2000; 31(10): 2295-300.

18. Sanchez-Moreno C, Dashe JF, Scott T, Thaler D, Folstein MF, Martin A. Decreased levels of plasma vitamin C and increased concentrations of inflammatory and oxidative stress markers after stroke. *Stroke* 2004; 35(1): 163-8.

19. Ranjan A, Theodore D, Haran RP, Chandy MJ. Ascorbic acid and focal cerebral ischaemia in a primate model. *Acta Neurochir (Wien)* 1993; 123(1-2): 87-91.

20. Allahtavakoli M, Rezaee H, Kamrany N, Shamsizadeh A, Moloudi R, Amin F. Effect of ascorbic acid on infarct volume and neurological deficits after the embolic model of stroke in rat. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2009; 8(1): 49-58. [In Persian].

21. Slivka A, Murphy E, Horrocks L. Cerebral edema after temporary and permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke* 1995; 26(6): 1061-5.

22. Fraser PA. The role of free radical generation in increasing cerebrovascular permeability. *Free Radic Biol Med* 2011; 51(5): 967-77.

23. Jiao H, Wang Z, Liu Y, Wang P, Xue Y. Specific role of tight junction proteins claudin-5, occludin, and ZO-1 of the blood-brain barrier in a focal cerebral ischemic insult. *J Mol Neurosci* 2011; 44(2): 130-9.

24. Bemeur C, Ste-Marie L, Desjardins P, Vachon L, Butterworth RF, Hazell AS, et al. Dehydroascorbic acid normalizes several markers of oxidative stress and inflammation in acute hyperglycemic focal cerebral ischemia in the rat. *Neurochem Int* 2005; 46(5): 399-407.

25. Orbe J, Rodriguez JA, Calvo A, Grau A, Belzunce MS, Martinez-Caro D, et al. Vitamins C and E attenuate plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression in a hypercholesterolemic porcine model of angioplasty. *Cardiovasc Res* 2001; 49(2): 484-92.

26. Nunes GL, Sgoutas DS, Redden RA, Sigman SR, Gravanis MB, King SB, III, et al. Combination of vitamins C and E alters the response to coronary balloon injury in the pig. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15(1): 156-65.

27. Rodriguez JA, Grau A, Eguinoa E, Nespereira B, Perez-Ilzarbe M, Arias R, et al. Dietary supplementation with vitamins C and E prevents downregulation of endothelial NOS expression in hypercholesterolemia in vivo and in vitro. *Atherosclerosis* 2002; 165(1): 33-40.

28. McCormick J, Barry SP, Sivarajah A, Stefanutti G, Townsend PA, Lawrence KM, et al. Free radical scavenging inhibits STAT phosphorylation following in vivo ischemia/reperfusion injury. *FASEB J* 2006; 20(12): 2115-7.

29. Wang YF, Tsirka SE, Strickland S, Stieg PE, Soriano SG, Lipton SA. Tissue plasminogen activator (tPA) increase neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nature Medicine* 1998; 4: 228-31.

30. Nassar NN, Abdelsalam RM, Abdel-Rahman AA, Abdallah DM. Possible involvement of oxidative stress and inflammatory mediators in the protective effects of the early preconditioning window against transient global ischemia in rats. *Neurochem Res* 2012; 37(3): 614-21.

31. Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med* 2009; 7: 97.

32. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 2001; 53(1): 135-59.

33. Castillo J, Davalos A, Noya M. Progression of ischaemic stroke and excitotoxic aminoacids. *Lancet* 1997; 349(9045): 79-83.

34. Bond M, Chase AJ, Baker AH, Newby AC. Inhibition of transcription factor NF-kappaB reduces matrix metalloproteinase-1, -3 and -9 production by vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2001; 50(3): 556-65.

35. Agus DB, Gambhir SS, Pardridge WM, Spielholz C, Baselga J, Vera JC, et al. Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters. *J Clin Invest* 1997; 100(11): 2842-8.

36. Lam DK, Daniel PM. The influx of ascorbic acid into the rat's brain. *Q J Exp Physiol* 1986; 71(3): 483-9.

37. Patterson JW. The diabetogenic effect of dehydroascorbic acid. *Endocrinology* 1949; 45(3): 344.

38. Polidori MC, Pratico D, Ingegni T, Mariani E, Spazzafumo L, del Sindaco P, et al. Effects of vitamin C and aspirin in ischemic stroke-related lipid peroxidation: results of the AVASAS (Aspirin Versus Ascorbic acid plus Aspirin in Stroke) Study. *Biofactors* 2005; 24(1-4): 265-74.

39. Ullegaddi R, Powers HJ, Gariballa SE. Antioxidant supplementation with or without B-group vitamins after acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2006; 30(2): 108-14.

40. Ullegaddi R, Powers HJ, Gariballa SE. Antioxidant supplementation enhances antioxidant capacity and mitigates oxidative damage following acute ischaemic stroke. *Eur J Clin Nutr* 2005; 59(12): 1367-73.

41. Henry PT, Chandy MJ. Effect of ascorbic acid on infarct size in experimental focal cerebral ischaemia and reperfusion in a primate model. *Acta Neurochir (Wien)* 1998; 140(9): 977-80.

Efficacy of Ascorbic Acid in Reduction of Stroke Complications in a Permanent Model of Middle Cerebral Artery Occlusion in Male Rats

Fatemeh Amin, M.Sc.[1], Amin Taghavi-Rafsanjani, M.Sc.[2], Ali Shamsizadeh, Ph.D.[3], Amir Moosaei, M.Sc.[2], Shayan Rezayi, M.Sc.[2], Ali Hasani[2], Sodabeh Naderi, [4], Sedigheh Esmaeili, B.Sc.[4], Mohammad Allahtavakoli, Ph.D.[3*]

1. Department of Physiology, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
2. Ph.D. Student, Department of Physiology, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
3. Associate Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
4 M.Sc. Student, Department of Physiology, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

* Corresponding author; e-mail: allahtavakoli@gmail.com

(Received: 28 March 2014 Accepted: 3 Dec. 2014)

Abstract

Background & Aims: Stroke is the third leading cause of death. Oxidative stress has a principal role in the complications of stroke. Due to this fact and the antioxidant effects of ascorbic acid, this study was designed to evaluate the effect of ascorbic acid on reduction of stroke complications in a permanent model of middle cerebral artery (MCA) occlusion in male rats.

Methods: In this experimental study, the rats were divided into 3 groups of control, ascorbic acid, and surgical sham. Stroke was induced by cauterization of MCA. The animals' brain was sliced and stained using tetrazolium chloride (TTC) 48 hours after stroke induction. Then, infarction volume was determined using image processing software. In addition, behavioral tests, such as neurologic deficits, were evaluated 24 and 48 hours after stroke induction. Data were statistically analyzed using One-way ANOVA test.

Results: The infarct volume significantly reduced in the ascorbic acid treated group in comparison with control group ($P < 0.010$). Moreover, blood-brain barrier (BBB) breakdown, brain edema volume ($P < 0.001$), and the level of matrix metallopeptidase-9 (MMP-9) ($P < 0.050$) significantly reduced following treatment by ascorbic acid. Neurologic deficits, which were assessed using the Bederson Grading System, showed relative improvement in the ascorbic acid treated group ($P < 0.050$).

Conclusion: This study showed that ascorbic acid, due to its neuroprotective effects, can significantly reduce the complications of stroke.

Keywords: Ascorbic acid, Neuroprotection, Stroke

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2015; 22(5): 457-469