

ارزیابی اثرات محافظت نوروپی پیتاواستاتین در آسیب‌های ناشی از خون‌رسانی مجدد در مدل ایسکمی موضعی و گذرای مغز در موش صحرایی بزرگ آزمایشگاهی

فاطمه منصوری^۱ (M.D.)، محمدتقی محمدی^{۲*} (Ph.D.)، شیما شهید^۳ (Ph.D.)، جواد حسینی نژاد^۴ (M.D.)

۱- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران

۲- گروه فیزیولوژی و فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران

۳- مرکز علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران

۴- گروه نورولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۴/۷

Mohammadi.mohammad@yahoo.com

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۷۷۱۳۵۸۳

چکیده

هدف: پیتاواستاتین جزء داروهای گروه استاتین‌ها بوده و عمدتاً برای درمان دیس‌لیپیدمی و کاهش کلسترول خون استفاده می‌شود. با توجه به اثرات ضدالتهابی، رگ‌زایی، ضداکسیدانی، ضدآپوپتوزی و ضدپلاکتی پیتاواستاتین، در مطالعه حاضر، تاثیر محافظتی آن در آسیب‌های مغزی ناشی از خون‌رسانی مجدد و ادم در مدل حیوانی ایسکمی موضعی و گذرای مغزی بررسی گردید. مواد و روش‌ها: ۲۱ سر موش صحرایی بزرگ آزمایشگاهی در سه گروه زیر قرار گرفتند: گروه‌های شاهد، کنترل ایسکمی و ایسکمی درمان شده. ایسکمی - خون‌رسانی مجدد از طریق انسداد شریان میانی مغز (MCAO) به مدت ۹۰ دقیقه و به دنبال آن ۲۴ ساعت خون‌رسانی مجدد انجام گردید. حیوانات پیتاواستاتین را به میزان ۴mg/kg به‌طور داخل صفاقی بلافاصله بعد از پایان MCAO دریافت کردند. شاخص اختلالات عصبی (NDS)، حجم ضایعه مغز و تورم مغزی، به عنوان شاخص ادم، ۲۴ ساعت پس از پایان MCAO بررسی شدند.

یافته‌ها: القای MCAO سبب ایجاد اختلالات عصبی (۳/۲۸±۰/۲۸) و ضایعه مغزی (۲۹۹±۲۱ mm³) در گروه کنترل ایسکمی به‌همراه تورم مغزی (۱۱/۸۳±۲/۶۱ درصد) گردید. دریافت پیتاواستاتین در موش‌های ایسکمی درمان‌شده اختلالات عصبی (۱/۰±۵۷/۲۰)، ضایعه (۱۱۷±۲۸ mm³) و تورم مغزی (۴/۷۵±۰/۸۰ درصد) را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. هم‌چنین، پیتاواستاتین به‌طور قابل ملاحظه‌ای میزان مرگ و میر حیوانات گروه ایسکمی درمان شده را کاهش داد. نتیجه‌گیری: یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد پیتاواستاتین، به‌عنوان یک عامل محافظت‌کننده نوروپی قوی، به‌طور مؤثری آسیب‌های مغزی ناشی از خون‌رسانی مجدد و ادم مغز را مستقل از اثرات کاهندگی کلسترول خون در مدل تجربی سکتی ایسکمی کاهش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: خون‌رسانی مجدد، پیتاواستاتین، سکتی ایسکمی، ضایعه مغزی، تورم مغزی

سکتی مغزی به دو منطقه مرکزی (core) و محیطی (penumbra) تقسیم می‌شود. در ناحیه مرکزی، به دلیل کاهش شدید و یا قطع جریان خون، سلول‌های بافت عصبی آسیب جدی دیده و در همان لحظات اول از بین می‌روند [۵]. در حالی که سلول‌های ناحیه محیطی به دلیل تغذیه مختصر از عروق جانبی می‌توانند تا مدتی زنده بمانند اما از لحاظ عملکردی غیرفعال هستند [۳]. ضایعات و آسیب‌های ناشی از ایسکمی مغزی از مجموعه‌ی عوامل پیچیده پاتوفیزیولوژی هم‌چون کاهش اکسیژن و مواد تغذیه‌ای مورد نیاز سلول، کاهش برداشت مواد زائد متابولیکی از محیط سلول‌های بافت عصبی و نهایتاً تولید مواد مسموم‌کننده

مقدمه

سکتی مغزی به عنوان شایع‌ترین بیماری پس از سرطان و بیماری‌های قلبی و عروقی شناخته شده و عامل سوم مرگ و میر در جهان محسوب می‌شود [۱]. گرچه شیوع سکتی مغزی در دهه‌های اخیر به دلیل پیشرفت علم پزشکی تا حدودی کاهش یافته اما در میان بیماری‌های مغز و اعصاب بزرگسالان به لحاظ میزان شیوع و پیامدهای ناشی از آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [۲]. هم‌چنین این بیماری علاوه بر بروز مرگ در قربانیان خود موجب بروز ناتوانی شدید در ۵۰ درصد از نجات‌یافته‌گان می‌گردد [۳، ۴]. از لحاظ شدت ایسکمی، ناحیه

اندوتلیال عروقی، مهار تجمع پلاکتی و تقویت رگ‌زایی اشاره نمود که در بیماران سکنه مغزی ایسکمی می‌تواند اثرات محافظت نوروئی داشته باشد [۱۷]. بر اساس نتایج تحقیقات انجام شده استفاده از استاتین‌ها در بسیاری از بیماری‌های عصبی-عروقی مانند سکنه مغزی، و بیماری‌های مخرب پیش‌رونده عصبی مثل آلزایمر، پارکینسون و مولتیپل اسکلروزیس دارای اثرات محافظت‌کننده نوروئی است [۱۸-۲۱]. پیتاواستاتین یکی از اعضای نسبتاً جدید این دسته از داروها بوده و شواهد آزمایشگاهی توانایی این دارو در کاهش ضایعه ناشی از ایسکمی مغزی و محافظت از بافت عصبی حین سکنه مغزی را به خوبی نشان می‌دهد [۲۲، ۲۳]. بر اساس یافته‌های یک تحقیق بالینی استفاده از پیتاواستاتین به همراه عصاره گیاه دانگ‌هونگ در بیماران سکنه مغزی علاوه بر بهبود سطوح چربی‌های خون، پاسخ‌های التهابی و شاخص‌های استرس اکسیداتیو را بهبود داده و باعث بهبود عملکرد بافت عصبی شده است [۲۴]. در این میان استفاده از پیتاواستاتین در مقایسه با سایر استاتین‌ها مانند آتورواستاتین به طور موثرتری میزان وقوع حمله‌های قلبی و عروقی در بیماران آترواسکلروتیک با کلسترول بالا را کاهش می‌دهد [۱۲]. بر اساس یافته‌های آزمایشگاهی استفاده از پیتاواستاتین در حیوان آزمایشگاهی میزان ضایعه هیپوکامپ و آسیب نوروئی این ناحیه در مدل گذرای ایسکمی مغزی را کاهش داده [۲۵، ۲۶]، و میزان بیان فاکتور نسخه‌برداری کاپا B (NF-kappa B) و p53 را در حین سکنه ایسکمی مغز کاهش می‌دهد [۲۷]. هم‌چنین پیتاواستاتین از آسیب کلیوی ناشی از سندروم عروق کرونری مزمن جلوگیری کرده و باعث بهبود عملکرد کلیه در این بیماران می‌گردد [۲۸].

گرچه با توجه به مطالعات ارائه شده پیتاواستاتین می‌تواند اثرات محافظت‌کننده نوروئی در حین سکنه مغزی داشته باشد اما اثرات مفید این دارو در جلوگیری از آسیب‌های ناشی از خون‌رسانی مجدد کم‌تر مورد بررسی قرار گرفته است. از این رو به دلیل اثرات ضداکسیدانی، ضدالتهابی و محافظت‌کننده نوروئی پیتاواستاتین، مطالعه حاضر به منظور بررسی تاثیر محافظتی داروی پیتاواستاتین بر اختلالات عصبی-حرکتی، ضایعه و تورم ناشی از آسیب خون‌رسانی مجدد مغزی در مدل تجربی سکنه ایسکمی مغزی طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

حیوانات و نحوه نگه‌داری. در این تحقیق که یک مطالعه تجربی بود از ۲۱ سر موش صحرایی بالغ نر نژاد ویستار که از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه

سلولی ناشی می‌شوند [۷، ۶]. این عوامل ذکر شده سبب دپولاریزاسیون غیر قابل کنترل نوروئی، آزادسازی اسیدهای آمینه تحریکی، تجمع سیتوکاین‌ها و فاکتورهای التهابی متفاوت، تولید انواع رادیکال‌های آزاد، ایجاد اسیدوز و افزایش کلسیم داخل سلولی در نواحی ایسکمی شده و منجر به القای مرگ نوروئی و گسترش ضایعه‌ی ناشی از ایسکمی مغزی می‌گردند [۳، ۸]. برقراری مجدد جریان خون (خون‌رسانی مجدد) به ناحیه ایسکمی، گرچه باعث رسیدن اکسیژن، مواد تغذیه‌ای مورد نیاز سلول‌ها و برداشت مواد زائد متابولیکی می‌شود ولی در مواردی ممکن است با ازدیاد تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن، تجمع کلسیم داخل سلولی، و هم‌چنین افزایش بیان فاکتورهای متعدد التهابی و مخرب نوروئی باعث تشدید آسیب‌های ناشی از ایسکمی و سکنه مغزی گردد [۹، ۱۰].

علی‌رغم پیشرفت‌های گسترده در علم پزشکی و درک نسبی پاتوفیزیولوژی ایسکمی و سکنه مغزی، هنوز روش‌های درمانی موثر و کامل برای جلوگیری از پیامدهای این بیماری وجود ندارد. گرچه استفاده از فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی نوترکیب، تنها داروی موثر و نسبتاً کارآمد برای درمان این بیماری محسوب می‌شود اما استفاده از آن به دلیل پنجره درمانی کوتاه‌مدت و عوارض ناشی از خطر خونریزی دارای محدودیت‌هایی است [۱۱]. بر این اساس شناسایی و معرفی داروهای جدید و کارآمد برای کاهش ضایعه مغزی و سایر عوارض ناشی از سکنه مغزی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده که در این راستا استفاده از استاتین‌ها می‌تواند یکی از این موارد باشد [۱۲]. داروهای گروه استاتین جزء مهارکننده‌های رقابتی آنزیم ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلوکوتاریل کوآنزیم-آ (HMG-CoA) ردوکتاز هستند که از طریق مهار کبدی این آنزیم سبب کاهش کلسترول خون می‌شوند. این دسته از داروها عمدتاً برای درمان دیس‌لیپیدمی موثر بوده و جهت کاهش کلسترول خون به کار می‌روند. نتایج مطالعات نشان می‌دهند استاتین‌ها می‌توانند به عنوان خط اول درمان در کاهش خطرات و عوارض ناشی از بیماری‌های قلبی و عروقی موثر و مفید واقع شوند [۱۳]. در این راستا استفاده از استاتین‌ها به عنوان یکی از ترکیبات موثر در پیشگیری و درمان بیماری‌های عروق کرونر مطرح بوده و مصرف این داروها در همه بیماران دچار حوادث حاد کرونری حتی بدون بالا بودن سطح لیپیدهای سرمی تأثیر مثبتی در بهبود این بیماران داشته است [۱۲]. این دسته از داروها علاوه بر خاصیت پایین‌آوردگی کلسترول و تری‌گلیسیرید خون، دارای اثرات ضدالتهابی، گشادکنندگی عروقی، ضداکسیدانی و ضدآپوپتوزی هستند [۱۴-۱۶]. در میان سایر اثرات چندگانه مفید این داروها می‌توان به افزایش تولید نیتریک اکساید

الله (عج) در محدوده وزنی ۲۷۰ تا ۳۲۰ گرم خریداری می‌شدند، استفاده گردید. حیوانات قبل از مطالعه و در طی آزمایش در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی، رطوبت مناسب، درجه حرارت ۲۵°C و با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. تمام آزمایش‌ها بر طبق مقررات اخلاقی کار با حیوانات، مصوب شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) انجام گردید. کد مصوب کمیته اخلاق برای مطالعه حاضر IR.BMSU.AEC.1401.017 بود.

القای ایسکمی - خون‌رسانی مجدد مغز. برای آماده‌سازی حیوان جهت ایجاد ایسکمی موقتی - موضعی مغز از روش ارائه شده توسط Longa و همکاران استفاده گردید [۲۹]. در ابتدا موش‌های صحرایی توسط ایزوفلوران ۲/۵ درصد (فوران، انگلستان) بی‌هوش شدند. بعد از تثبیت حیوان بر روی میز جراحی، ناحیه گردن از وسط باز شده و بافت هم‌بند و عضلات را کنار زده تا امکان دسترسی آسان به شریان کاروتید مشترک و شاخه‌های آن (خارجی و داخلی) فراهم گردد. در گروه‌های ایسکمی، با بستن موقت شریان کاروتید مشترک طرف راست شکاف ظریفی در شاخه شریان کاروتید خارجی ایجاد نموده و هم‌زمان با بستن قسمت پائین آن نخ نایلون آماده شده (شماره ۰-۳) که نوک آن توسط حرارت گرد شده و سطح آن با پلی‌ال-لیزین پوشانده شده را از راه شکاف ایجاد شده وارد شریان کاروتید داخلی و از آن‌جا به آرامی به داخل جمجمه و به طرف حلقه ویلیس هدایت کرده تا به ابتدای شریان میانی مغز برسد. با عبور نوک نخ از ابتدای شریان میانی مغز، مقاومت اندکی در هدایت آن ایجاد می‌شد. بعد از اطمینان از قرارگیری نخ آماده شده در محل مورد نظر نخ نایلون به مدت ۹۰ دقیقه در محل تثبیت می‌شد. برای خاتمه ایسکمی و آغاز خون‌رسانی مجدد نخ نایلون را به آرامی از رگ بیرون آورده و با بستن شریان کاروتید خارجی زخم‌های ایجاد شده در ناحیه گردن را بخیه زده و حیوان تا به هوش آمدن در محل گرم نگهداری می‌شد. در تمام دوره آزمایش تا خاتمه بی‌هوشی درجه حرارت حیوان با کمک لامپ گرم‌کننده در محدوده ۳۷-۳۸ درجه سانتی‌گراد ثابت نگه داشته می‌شد. بعد از هوشیاری کامل، حیوانات به قفس‌های مورد نظر منتقل و تا انجام آزمایش‌های بعدی در شرایط مناسب نگهداری می‌شدند.

طراحی آزمایش و گروه‌بندی مطالعه. طراحی مطالعه حاضر در این تحقیق بدین صورت بود که در ابتدا حیوانات مورد نظر به صورت تصادفی در سه گروه به شرح زیر قرار می‌گرفتند. در گروه شاهد (Sham, n=۷) حیوانات بعد از القای بی‌هوشی، تحت عمل جراحی جهت انسداد شریان میانی مغز با آشکارسازی شریان کاروتید مشترک و شریان‌های کاروتید

خارجی و داخلی در ناحیه گردن قرار می‌گرفتند اما مرحله نهایی یعنی عمل انسداد شریان میانی مغز صورت نمی‌پذیرفت. بعد از گذشت ۹۰ دقیقه از انجام جراحی در ناحیه گردن، زخم‌های ایجاد شده توسط نخ بخیه به‌طور مناسب دوخته شده و حیوان پس از به‌دست آوردن هوشیاری کامل به قفس مورد نظر خود منتقل می‌گردید. سپس ۲۴ ساعت بعد از پایان جراحی مربوط به انسداد شریان میانی مغز، حیوانات جهت ثبت متغیرهای مورد نظر مانند اختلالات عصبی - حرکتی و همچنین ضایعه و تورم مغزی مورد ارزیابی قرار گرفتند. در گروه کنترل ایسکمی (IR, n=۷) ابتدا حیوانات مشابه گروه شاهد بعد از القای بی‌هوشی، تحت عمل جراحی جهت انسداد شریان میانی مغز قرار گرفتند. پس از القای ایسکمی به مدت ۹۰ دقیقه، مرحله خون‌رسانی مجدد با بیرون کشیدن آهسته فیلامان شروع گردید. ارزیابی اختلالات عصبی - حرکتی ۲۴ ساعت بعد از شروع مرحله خون‌رسانی مجدد در حیواناتی که زنده می‌مانند، انجام می‌گردید. سپس تحت بی‌هوشی عمیق، با تزریق داخل صفاقی تیوپنتال سدیم، حیوانات کشته شده و بعد از جدا کردن سر، مغز با احتیاط کامل از جمجمه خارج گردیده و جهت بررسی متغیرهای مورد نظر آماده‌سازی شد. در گروه ایسکمی تیمار با پیتاواستاتین (IR+Pit, n=۷) تمامی مراحل انجام آزمایش از جمله القای بی‌هوشی و جراحی جهت فیلامان‌گذاری برای القای ایسکمی - خون‌رسانی مجدد مشابه گروه کنترل ایسکمی انجام گردید. حیوانات این گروه داروی پیتاواستاتین به میزان mg/kg ۴ و به صورت داخل صفاقی در ابتدای مرحله خون‌رسانی مجدد دریافت نمودند. در نهایت ۲۴ ساعت بعد از آغاز خون‌رسانی مجدد، ارزیابی اختلالات عصبی - حرکتی انجام گرفت و سپس حیوانات تحت بی‌هوشی عمیق، با تزریق داخل صفاقی تیوپنتال سدیم، کشته شده و بعد از جدا کردن سر، مغز با احتیاط کامل از جمجمه خارج و جهت ارزیابی متغیرهای مورد نظر آماده گردید. لازم به ذکر است تعداد حیوانات ارائه شده در هر گروه شامل حیواناتی هستند که در مراحل مختلف آزمایش زنده ماندند. از این رو نتایج به‌دست آمده از حیواناتی که در طول انجام آزمایش به هر دلیلی تلف شدند از مطالعه حذف گردید.

داروی مورد استفاده در این تحقیق برای تیمار حیوانات پیتاواستاتین بود که از شرکت سیگما (امریکا) خریداری شد. جهت آماده‌سازی پیتاواستاتین برای تزریق، ابتدا پودر خریداری شده توسط ترازوی دقیق دیجیتالی وزن شده و به صورت تازه با محلول نرمال سالین حل گردید. سپس محلول تازه تهیه شده، پس از محاسبه مقدار تزریق (۴mg/kg) برای هر حیوان، به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. میزان حجم تزریقی محلول دارو بین نیم تا یک میلی‌لیتر بسته به وزن حیوان محاسبه شد

(Corrected infarction volume) بر اساس فرمول زیر محاسبه شد.

[حجم ضایعه اندازه‌گیری شده - حجم نیمکره ایسکمی نشده] - حجم نیمکره ایسکمی نشده = میزان ضایعه اصلاح شده (میلی متر مکعب) اندازه‌گیری درصد تورم مغزی (شاخص ادم مغزی). برای اندازه‌گیری درصد تورم بافت مغزی در نیمکره ایسکمی شده (Tissue swelling%) از روش سوانسون و همکاران استفاده شد. در این روش حجم نیمکره ضایعه دیده (راست) و حجم نیمکره سالم (چپ) بر حسب میلی متر مکعب (mm^3)، در برش‌های رنگ‌آمیزی شده تعیین و درصد تورم بافتی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید [۳۲].

$100 \times \frac{\text{حجم نیمکره سالم} - \text{حجم نیمکره سالم}}{\text{حجم نیمکره ضایعه دیده}}$
= تورم بافت مغز در نیمکره ایسکمی (درصد)

روش آنالیز آماری. در ابتدا برای مشخص شدن توزیع نرمال داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف استفاده گردید. برای مقایسه داده‌های به‌دست آمده بین گروه‌های مختلف، که توزیع نرمال داشتند، از روش آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) و از تست تعقیبی Tukey استفاده گردید. هم‌چنین برای مقایسه داده‌های اختلالات عصبی-حرکتی از روش مقایسه‌ای غیر پارامتریک (Nonparametric) و تست آماری Mann-Whitney U استفاده شد. نتایج به‌دست آمده به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین (Mean \pm SEM) ارائه شد. در تمامی مقایسه‌ها $P < 0.05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار تلقی گردید.

نتایج

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد استفاده از پیتاواستاتین پس از خاتمه ایسکمی و در آغاز مرحله خون‌رسانی مجدد می‌تواند آسیب‌های ناشی از سکنه ایسکمی مغز و هم‌چنین مرگ و میر حیوانات در مدل آزمایشگاهی سکنه ایسکمی مغزی در موش صحرایی بزرگ آزمایشگاهی را کاهش دهد (جدول ۱).

جدول ۱. تعداد حیوانات مورد استفاده و درصد مرگ و میر آن‌ها

گروه‌ها	تعداد کل حیوانات استفاده شده		حیوانات زنده مانده	حیوانات مرده	مرگ و میر (%)
	حیوانات کل	حیوانات استفاده شده			
شاهد (Sham)	۷	۷	۷	۰	۰
کنترل ایسکمی (IR)	۱۲	۷	۷	۵	۴۱
ایسکمی درمان شده (IR+Pit)	۹	۷	۷	۲	۲۲

تعداد نهایی حیوانات موجود در هر گروه شامل موش‌های صحرایی بزرگ آزمایشگاهی زنده مانده در طول آزمایش هستند.

که معادل آن محلول نرمال سالین به حیوانات گروه شاهد و کنترل ایسکمی بعد از خاتمه جراحی تزریق گردید.

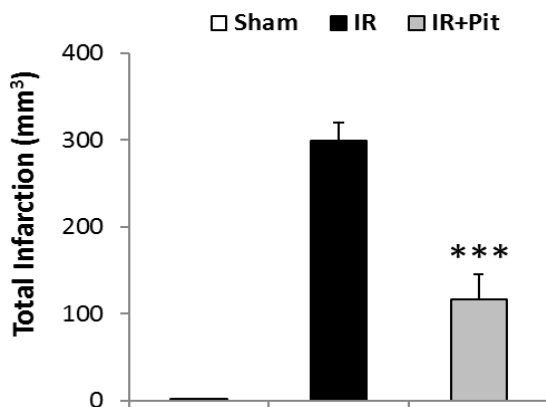
بررسی اختلالات عصبی-حرکتی. در حیواناتی که تا ۲۴ ساعت بعد از پایان دوره ایسکمی زنده می‌ماندند اختلالات عصبی-حرکتی با به‌کارگیری تست پنج نمره‌ای توسط فردی که نسبت به گروه تیمار شده آگاهی نداشت مورد ارزیابی قرار گرفت [۳۰]. در این روش به صورت قراردادی اختلالات عصبی-حرکتی حیوان به شرح زیر از نمره ۱ تا ۵ درجه‌بندی شده است. نمره ۱ به حیواناتی داده می‌شد، از جمله حیوانات گروه شاهد، که هیچ‌گونه اختلال حرکتی نداشتند. نمره ۲ برای حیوانی در نظر گرفته می‌شد که دست سمت متقابل نیمکره ایسکمی شده (دست چپ) را موقع آویزان شدن از دم خم می‌نمود (حالت Flexion). نمره ۳ به حیوانی تعلق می‌گرفت که در شروع حرکت در یک سطح صاف به سمت مقابل نیمکره ایسکمی شده (سمت چپ) می‌چرخید. حیوانی که رفلکس ایستادن را از دست داده بود نمره ۴ و در نهایت نمره ۵ به حیواناتی داده می‌شد که فاقد هر گونه حرکت خودبه‌خودی بودند.

اندازه‌گیری حجم ضایعه مغزی. جهت اندازه‌گیری حجم ضایعه مغزی، حیوانات گروه شاهد ۲۴ ساعت پس از جراحی و گروه‌های ایسکمی (کنترل ایسکمی و ایسکمی درمان شده) ۲۴ ساعت پس از آغاز خون‌رسانی مجدد با تزریق داخل صفاقی تیوپنتال سدیم به طور عمیق بی‌هوش گردیدند. برای اندازه‌گیری حجم ضایعه مغزی در نیمکره ایسکمی شده، ابتدا مغز خارج شده از جمجمه را برای سخت شدن به مدت ۵ دقیقه در نرمال سالین ۴ درجه قرار داده و سپس با استفاده از ماتریکس مغزی شش برش عرضی (Coronal) به قطر ۲ میلی متر تهیه و جهت رنگ‌آمیزی به مدت ۲۰ دقیقه در محلول ۲ درصد تری فنیل تترازولیوم کلراید (TTC) قرار داده شد. در این روش رنگ‌آمیزی، ناحیه ایسکمی شده مغز به رنگ سفید و نواحی سالم به رنگ قرمز آجری در می‌آید. برش‌های رنگ شده را جهت تثبیت شدن به مدت ۲۴ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد بافر شده قرار داده و بعد از آماده‌سازی نهایی، از هر شش برش به‌طور جداگانه توسط دوربین دیجیتال (Cannon, Japan) عکس گرفته و سطح ناحیه ضایعه دیده و در نهایت حجم ایسکمی مغز با استفاده از کامپیوتر و نرم‌افزار مخصوص (NIH image Analyzer) با روش ارائه شده در مطالعات قبلی محاسبه گردید [۳۱]. میزان حجم ضایعه در کورتکس، استریاتوم و حجم کل (مجموع کورتکس و استریاتوم) بر حسب میلی متر مکعب (mm^3)، برای تمامی برش‌ها جمع و میزان ضایعه اصلاح شده

میزان کمی ضایعه مغزی را به میزان معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی کاهش دهد ($P < 0.001$). به طوری که مقادیر کمی ضایعه در نیمکره ایسکمی شده حیوانات این گروه برابر با $28 \pm 117 \text{ mm}^3$ بود. در راستای تایید این نتایج، در ارزیابی کیفی سطح ضایعه در برش‌های کروئال توسط مقایسه چشمی نیز کاهش میزان ضایعه ایسکمی در حیوانات گروه ایسکمی تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی مشهود بود.

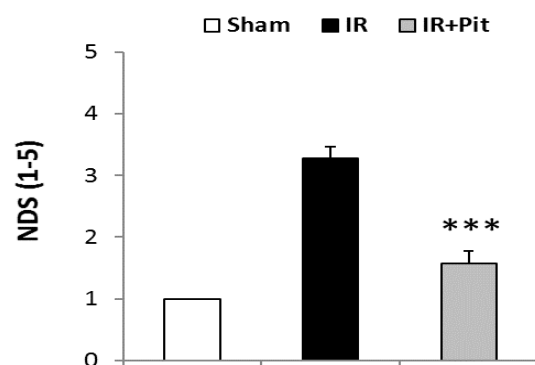


شکل ۲. تصویر تهیه شده از برش‌های کروئال مغزی رنگ آمیزی شده به روش تری فنیل تترازولیوم کلراید (TTC) ۲۴ ساعت بعد از خاتمه جراحی در گروه شاهد (Sham) و ۲۴ ساعت پس از آغاز خون‌رسانی مجدد در گروه‌های کنترل ایسکمی (IR) و ایسکمی تیمار شده با پیتاواستاتین (IR+Pit). مناطق سفید رنگ نشان دهنده نواحی ایسکمی شده و مناطق قرمز نشان دهنده نواحی سالم مغز است. (Scale bar: 1 cm).



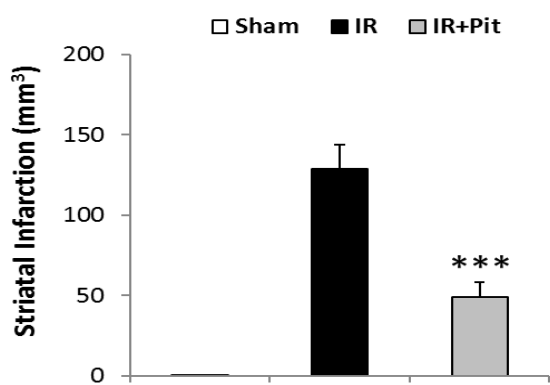
شکل ۳. حجم ضایعه کل در نیمکره ایسکمی شده بر حسب میلی متر مکعب (mm^3) ۲۴ ساعت بعد از جراحی در گروه شاهد (Sham) و ۲۴ ساعت پس از آغاز خون‌رسانی مجدد در گروه‌های کنترل ایسکمی (IR) و ایسکمی تیمار شده با پیتاواستاتین (IR+Pit). داده‌ها به صورت Means+SEM نشان داده شده است. *** نشانگر تفاوت معنی‌دار با $P < 0.001$ در مقایسه با گروه IR.

اختلالات عصبی- حرکتی: نتایج حاصل از بررسی اختلالات عصبی- حرکتی در گروه‌های آزمایشی در شکل ۱ نشان داده شده است. در گروه شاهد جراحی میزان این متغیر برابر با ۱ از ۵ بود. در حالی که در گروه کنترل ایسکمی میزان عددی این متغیر برابر با $3/28 \pm 0/28$ بود که نشان می‌داد که القای ایسکمی - خون‌رسانی مجدد مغزی توانسته به مقدار زیادی اختلالات عصبی و حرکتی در حیوانات این گروه ایجاد نماید. مقدار عددی این متغیر در گروه ایسکمی - خون‌رسانی مجدد تیمار شده با پیتاواستاتین برابر $1/57 \pm 0/20$ از ۵ بود که نشان می‌داد تیمار با داروی پیتاواستاتین توانسته شاخص اختلالات عصبی- حرکتی را به طور معنی‌داری در مقایسه با حیوانات گروه کنترل ایسکمی بهبود بخشد ($P < 0.001$).



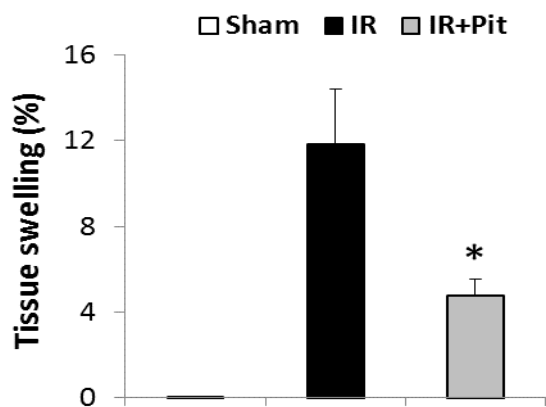
شکل ۱. شاخص اختلالات عصبی- حرکتی (NDS: neurological deficit score) حیوانات ۲۴ ساعت بعد از پایان جراحی در گروه شاهد (Sham) و ۲۴ پس از شروع خون‌رسانی مجدد در گروه‌های کنترل ایسکمی (IR) و ایسکمی تیمار شده با پیتاواستاتین (IR+Pit). داده‌ها به صورت Means+SEM نشان داده شده است. *** نشانگر تفاوت معنی‌دار با $P < 0.001$ در مقایسه با گروه IR.

حجم ضایعه مغزی کل: بررسی میزان ضایعه مغزی در ارزیابی کیفی، که با مقایسه چشمی تصاویر تهیه شده از برش‌های کروئال مغز انجام شد، در شکل ۲ نشان داده شده است. یک‌نواختی رنگ قرمز آجری در برش‌های تهیه شده تایید بر عدم وجود ضایعه بافتی در نیمکره راست و چپ گروه شاهد و هم‌چنین نیمکره چپ گروه‌های ایسکمی تیمار شده و نشده بود. در حالی که القای ایسکمی - خون‌رسانی مجدد در حیوانات گروه کنترل ایسکمی توانست ضایعه نسبتاً وسیعی، که با رنگ سفید در قشر و زیر قشر نیمکره راست حیوانات این گروه قابل مشاهده بود، ایجاد نماید. در بررسی مقادیر کمی حجم ضایعه مغزی کل در نیمکره ایسکمی شده راست بر حسب میلی‌متر مکعب، که در شکل ۳ نمایش داده شده، مقادیر کمی ضایعه مغزی در حیوانات گروه کنترل ایسکمی برابر با $299 \pm 21 \text{ mm}^3$ و در حیوانات گروه شاهد برابر با صفر بود. در حالی که تیمار با داروی پیتاواستاتین در گروه ایسکمی درمان شده توانست



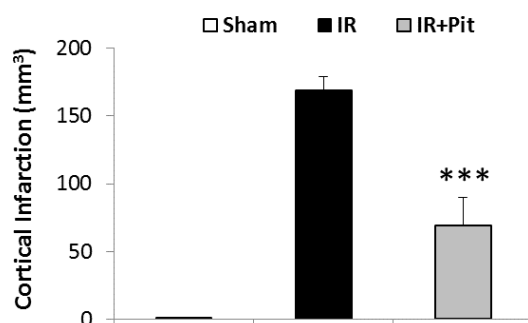
شکل ۵. حجم ضایعه استریاتوم (زیر قشر) در نیمکره ایسکمی شده بر حسب میلی متر مکعب (mm³) ۲۴ ساعت بعد از خاتمه جراحی در حیوانات گروه شاهد (Sham) و ۲۴ ساعت پس از آغاز خونرسانی مجدد در گروه‌های کنترل ایسکمی (IR) و ایسکمی تیمار شده با پیتاواستاتین (IR+Pit). داده‌ها به صورت Means±SEM نشان داده شده است. *** نشانگر تفاوت معنی دار با IR $p < 0.001$ در مقایسه با گروه IR

نتایج درصد تورم بافت مغز: مقادیر تشکیل تورم مغزی (درصد) نیمکره‌ی راست (ایسکمی) در شکل ۶ برای گروه‌های شاهد، کنترل ایسکمی و ایسکمی تیمار شده با پیتاواستاتین نشان داده شده است. درصد تشکیل ادم مغزی در گروه شاهد در حد صفر بود. در حالی که در گروه کنترل ایسکمی این میزان (درصد تورم مغز) افزایش قابل ملاحظه‌ای یافت و میزان آن $11/2 \pm 83/61$ درصد بود. درصد تورم نیمکره ایسکمی شده مغز در گروه ایسکمی درمان شده با پیتاواستاتین، که شاخصی از ادم مغزی بود، به طور معنی‌داری کاهش یافت و میزان آن $4/0 \pm 75/80$ درصد بود ($P < 0.05$).



شکل ۶. درصد محاسبه شده تورم مغزی در نیمکره ایسکمی شده (%) ۲۴ ساعت بعد از خاتمه جراحی در حیوانات گروه شاهد (Sham) و ۲۴ ساعت پس از آغاز خونرسانی مجدد در گروه‌های کنترل ایسکمی (IR) و ایسکمی تیمار شده با پیتاواستاتین (IR+Pit). داده‌ها به صورت Means±SEM نشان داده شده است. *** نشانگر تفاوت معنی دار با IR $p < 0.001$ در مقایسه با گروه IR

حجم ضایعه‌ی مغزی در نواحی قشر: شکل ۴ مقادیر کمی حجم ضایعه‌ی مغز در نواحی قشری نیمکره ایسکمی راست بر حسب میلی‌متر مکعب در گروه‌های شاهد، کنترل ایسکمی و ایسکمی درمان شده با پیتاواستاتین را نشان می‌دهد. در گروه شاهد، به دلیل این‌که انسداد شریان میانی مغز صورت نگرفته، میزان حجم ضایعه‌ی مغز در نیمکره‌ی راست این گروه برابر با صفر بود. القای ایسکمی - خون‌رسانی مجدد در گروه کنترل ایسکمی توانست ضایعه نسبتاً وسیعی در نواحی قشر نیمکره ایسکمی شده ایجاد نماید که میزان آن برابر با 169 ± 10 میلی‌متر مکعب بود. در گروه ایسکمی تیمار شده با پیتاواستاتین مقادیر حجم ضایعه‌ی قشری در نیمکره ایسکمی شده به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.001$)، و میزان آن برابر با 21 ± 69 میلی‌متر مکعب بود.



شکل ۴. حجم ضایعه قشر مغز در نیمکره ایسکمی شده بر حسب میلی‌متر مکعب (mm³) ۲۴ ساعت بعد از خاتمه جراحی در گروه شاهد (Sham) و ۲۴ ساعت بعد از شروع خونرسانی مجدد در گروه‌های کنترل ایسکمی (IR) و ایسکمی تیمار شده با پیتاواستاتین (IR+Pit). داده‌ها به صورت Means±SEM نشان داده شده است. *** نشانگر تفاوت معنی‌دار با IR $p < 0.001$ در مقایسه با گروه IR

حجم ضایعه‌ی مغزی در نواحی زیر قشر: شکل ۵ مقادیر کمی حجم ضایعه مغزی در نواحی زیر قشر (استریاتوم) در نیمکره‌ی ایسکمی (راست) بر حسب میلی‌متر مکعب در گروه‌های شاهد، کنترل ایسکمی، و ایسکمی درمان شده با پیتاواستاتین را نشان می‌دهد. در گروه شاهد به دلیل این‌که انسداد شریان میانی مغز صورت نگرفته میزان حجم ضایعه‌ی مغزی در این گروه برابر با صفر بود. القای ایسکمی - خون‌رسانی مجدد مغز توانست ضایعه نسبتاً وسیعی در نواحی زیر قشر نیمکره ایسکمی شده در گروه کنترل ایسکمی ایجاد نماید به طوری که میزان آن برابر با 129 ± 15 میلی‌متر مکعب بود. در گروه ایسکمی تیمار شده با پیتاواستاتین مقادیر حجم ضایعه‌ی زیر قشر در نیمکره ایسکمی شده به طور معنی‌داری کاهش یافت و میزان آن برابر با 49 ± 9 میلی‌متر مکعب بود ($P < 0.001$).

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های تحقیقات بالینی و آزمایشگاهی، پیتاواستاتین دارای اثرات محافظت‌کننده عصبی بوده که در این میان می‌توان به عنوان نمونه به اثرات ضدالتهابی، ضداکسیدانی و ضدآپوپتوزی آن اشاره نمود [۱۴-۱۶]. در این راستا مطالعه حاضر اثرات محافظت‌کنندگی این دارو با هدف کاهش آسیب‌های خون‌رسانی مجدد پس از سکته ایسکمی مغزی را مورد مطالعه قرار داد. یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد استفاده از پیتاواستاتین پس از خاتمه ایسکمی و در آغاز مرحله خون‌رسانی مجدد می‌تواند آسیب‌های ناشی از سکته ایسکمی مغز و هم‌چنین مرگ و میر حیوانات در مدل آزمایشگاهی سکته ایسکمی مغزی در موش صحرایی بزرگ آزمایشگاهی را کاهش دهد. بر اساس نتایج این تحقیق پیتاواستاتین علاوه بر کاهش ضایعه مغزی در نواحی ایسکمی شده مغز، باعث بهبود اختلالات عصبی - حرکتی در این حیوانات گردید. هم‌چنین پیتاواستاتین در تحقیق حاضر توانست میزان درصد تورم مغز، که شاخصی از ادم مغزی بوده، را در مدل ایسکمی موضعی و گذرای مغز در موش صحرایی بزرگ آزمایشگاهی کاهش دهد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد استفاده از داروی پیتاواستاتین بعد از القای ایسکمی و شروع خون‌رسانی مجدد مغزی توانسته، حجم ضایعه مغزی در نواحی قشری و زیرقشری در نیمکره ایسکمی شده به همراه اختلالات عصبی - حرکتی را به میزان زیادی کاهش دهد. پیتاواستاتین یکی از اعضای نسبتاً جدید از مهارکننده‌های آنزیم HMG-CoA ردوکتاز بوده و شواهد آزمایشگاهی نشان از موثر بودن این دارو در جهت جلوگیری از ضایعات بافت عصبی و مرگ نورونی در حین سکته مغزی را ارائه می‌دهند [۲۳، ۳۳]. بر اساس یافته‌های مطالعه Iqbal و همکاران استفاده از پیتاواستاتین در مدل تشنج القا شده با پنتیلن تترازول توانست علاوه بر کاهش آسیب در بافت عصبی، اختلالات شناختی و حرکتی را در این حیوانات بهبود بخشد [۳۴]. هم‌چنین یافته‌های مطالعه Matsubara و همکاران نشان داد استفاده از استاتین‌هایی مانند پیتاواستاتین به طور قابل توجهی خطر بروز تشنج‌های زودرس در بیماران مبتلا به ایسکمی مغزی حاد را کاهش می‌دهد [۳۵]. در مطالعه‌ای، Cui و همکاران نشان دادند استفاده از پیتاواستاتین در نورون‌های مغزی کشت داده شده در شرایط محرومیت از اکسیژن و گلوکز اثرات محافظت‌کنندگی دارد [۳۶]. در مطالعه Prado و همکاران، پیتاواستاتین توانست التهاب نورونی ناشی از پاسخ خود ایمنی در بیماری مولتیپل اسکلروز را از طریق مهار متابولیسم مولونات کاهش داده و علائم عصبی و حرکتی این بیماری را بهبود بخشد [۳۳]. علاوه بر نتایج حاصل از مطالعه‌ای

دیگر در یک کارآزمایی بالینی نشان داد استفاده از پیتاواستاتین ترکیب شده با نانوذرات در بیماران مبتلا به ایسکمی مزمن تهدیدکننده اندام، باعث بهبود عملکرد آن شده و خطر آسیب بافتی را کاهش می‌دهد [۳۷]. بر این اساس طبق نتایج مطالعات ارائه شده و هم‌چنین نتایج به‌دست آمده از این تحقیق می‌توان گفت پیتاواستاتین توانایی کاهش آسیب‌های ناشی از سکته مغزی ایسکمی را داشته و بر اختلالات عصبی - حرکتی ناشی از ایسکمی مغزی اثرات بهبودی‌بخش دارد.

یافته‌های مطالعات اخیر نشان می‌دهند پیتاواستاتین دارای اثرات محافظت‌کننده سلولی مفید و خوبی در شرایط مختلف پاتوفیزیولوژی بدن است [۱۳، ۳۳]. در میان این اثرات محافظتی چندگانه مفید پیتاواستاتین می‌توان به اثرات ضداکسیدانی، ضدالتهابی، ضدآپوپتوزی، افزایش تولید نیتریک اکساید اندوتلیالی، مهار تجمع پلاکتی و تقویت آنژیوژنز اشاره نمود که در بیماران سکته مغزی ایسکمی می‌تواند اثرات محافظت‌کننده نورونی داشته باشد [۱۷، ۳۸]. در این راستا kurosaki و همکاران در آسیب عصبی ناشی از ایسکمی گذرای مغزی پس از ۵ دقیقه با انسداد دوطرفه شریان‌های کاروتید مشترک در گوساله نشان دادند پیتاواستاتین از نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ از طریق تنظیم بیان آنزیم نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی محافظت کند [۳۹]. بر اساس یافته‌های یک مطالعه‌ی دیگر استفاده از پیتاواستاتین در مدل تشنج القا شده با پنتیلن تترازول توانست شدت تشنج و اختلالات شناختی ناشی از آن را به واسطه اثرات ضداکسیدانی و ضدالتهابی کاهش دهد [۳۴]. هم‌چنین طبق یافته‌های مطالعه Cui و همکاران، درمان با پیتاواستاتین از طریق فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) و کیناز وابسته به تروپومبوزین (TrkB) باعث اثرات محافظتی از سلول‌های عصبی پس از محرومیت از اکسیژن و گلوکز می‌شود [۴۰]. از طرفی استاتین‌ها سنتز کلسترول درون‌زاد را با مهار آنزیم HMG-CoA ردوکتاز، که آنزیم محدودکننده سرعت تولید کلسترول از مسیر مولونات بوده، را کاهش می‌دهند. اسید موالونیک به عنوان محصول آنزیم HMG-CoA ردوکتاز بوده و منشأ بسیاری از ایزوپروپونوئیدهایی است که به غیر از سنتز کلسترول نقش مهمی در فعال‌سازی سیگنال‌های مخرب داخل سلولی از قبیل آپوپتوز، التهاب، انعقاد، مهاجرت و چسبندگی لوکوسیت‌ها دارند [۴۱، ۴۲]. بر این اساس مهار سنتز ایزوپروپونوئیدها توسط پیتاواستاتین‌ها می‌تواند به عنوان بخشی از مکانیسم محافظتی در وقایع آسیب‌رسان سلولی ذکر شده که در زمان سکته مغزی فعال می‌شوند مفید واقع شده و سبب مهار ناشی از این سیگنال‌های مخرب گردد. گرچه در مطالعه حاضر تاثیر پیتاواستاتین بر سیگنال‌های سلولی ارائه شده مورد بررسی

اندوتلیال عروقی تحریک نماید [۴۷،۴۶]. بنابراین طبق نتایج مطالعات ارائه شده و همچنین نتایج به دست آمده از داده‌های ادم مغزی پیشنهاد می‌شود در تحقیق حاضر بخشی از کاهش تورم مغز در حیوانات تیمار شده با پیتاواستاتین مربوط به اثرات محافظت‌کننده عروقی و بهبودی بخش بر عملکرد سیستم سد خونی - مغزی در آسیب ایسکمی - خون‌رسانی مجدد مغزی است.

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد پیتاواستاتین ضایعه مغزی پس از سکنه ایسکمی مغز و همچنین پیامدهای ناشی از آن را کاهش می‌دهد. با این حال جهت افزایش قوت این ادعا، روند درمان نیازمند پیگیری طولانی‌مدت در حیوانات دچار سکنه مغزی است که در مطالعه حاضر با توجه به دشوار بودن موضوع نگاه‌داری حیوانات دچار سکنه مغزی در مدل به کار رفته و درصد بالای مرگ و میر این حیوانات امکان‌پذیر نبود. از طرفی برای درک مکانیسم‌های اثر محافظتی پیتاواستاتین در سکنه مغزی نیاز به بررسی سیگنال‌ها و عوامل محافظت‌کننده عصبی است که پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی مورد بررسی قرار گیرد. همچنین تاثیر پیتاواستاتین بر عوامل مخرب عصبی در آسیب‌های ناشی از ایسکمی - خون‌رسانی مجدد مغزی قابل بررسی می‌باشد.

یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد پیتاواستاتین، مستقل از اثرات کاهنگی کلسترول خون، به طور مؤثری آسیب‌های ایسکمی - خون‌رسانی مجدد مغزی را کاهش داده و باعث بهبود اختلالات عصبی - حرکتی در مدل تجربی سکنه مغزی ایسکمی می‌شود. بر این اساس با توجه به ماهیت محافظت‌کننده نورونی پیتاواستاتین، از این دارو می‌توان به عنوان یک عامل مؤثر در پیشگیری و یا کاهش پیامدهای سکنه مغزی ایسکمی به صورت تنها یا همراه با سایر داروهای مورد استفاده در سکنه مغزی ایسکمی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله از همکاری تمامی اساتید و همکاران گران‌قدر گروه فیزیولوژی و فیزیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) جهت انجام مطالعه حاضر تقدیر و تشکر می‌شود. همچنین از خداوند مهربان برای مرحوم آقای جواد رسولی ونی که در القای مدل حیوانی سکنه مغزی در طرح حاضر نقش فعالی داشتند غفران و رحمت‌الهی را مسئلت می‌نمایم.

قرار نگرفته است ولی به استناد مطالعات انجام شده در این زمینه و نقش سیگنال‌های سلولی فوق در پاتوفیزیولوژی سکنه مغزی می‌توان استنباط کرد استفاده از پیتاواستاتین در مطالعه حاضر احتمالاً از طریق مهار آن‌ها توانسته ضایعه ناشی از سکنه مغزی ایسکمی را کاهش داده و اختلالات عصبی - حرکتی را بهبود بخشد.

درصد تورم در نیمکره‌ی راست (ایسکمی)، به عنوان یک شاخص مهم برای اندازه‌گیری ادم مغز، متغیر دیگری بود که در مطالعه حاضر مورد ارزیابی قرار گرفت. استفاده از داروی پیتاواستاتین بعد از شروع ایسکمی و در آغاز مرحله خون‌رسانی مجدد توانست درصد تورم در نیمکره‌ی ایسکمی شده مغز را در حیوانات درمان شده نسبت به حیوانات گروه کنترل ایسکمی کاهش دهد. آسیب به سیستم عروقی و افزایش نفوذپذیری سیستم سد خونی - مغزی و به دنبال آن تشکیل ادم با منشا عروقی از پیامدهای مهم سکنه مغزی بوده و منجر به تشدید آسیب مغزی به دنبال سکنه ایسکمی می‌گردد [۳۱]. شواهد و نتایج به دست آمده از مطالعات نشان می‌دهد پیتاواستاتین می‌تواند به عنوان یک محافظت‌کننده عروقی از آسیب به سیستم سد خونی - مغزی جلوگیری نموده و میزان تشکیل ادم مغزی را پس از وقوع سکنه ایسکمی کاهش دهد. در مطالعه Fujimoto و همکاران، استفاده از داروی پیتاواستاتین، در مدل آزمایشگاهی (in vitro) کشت اولیه سلول‌های اندوتلیال جدا شده از عروق مغز موش کوچک آزمایشگاهی به همراه پری‌سایت‌ها و آستروسیت‌ها، اثرات محافظتی بر اختلال عملکرد سد خونی - مغزی ناشی از لیپوپلی‌ساکارید داشت. بر اساس نتایج این تحقیق پیتاواستاتین از اختلال عملکرد سد خونی - مغزی ناشی از لیپوپلی‌ساکارید با کاهش تولید سیتوکاین‌های التهابی جلوگیری کرد [۴۳]. در تحقیقی دیگر Morofuji و همکاران نشان دادند پیتاواستاتین عملکرد و ماهیت سیستم سد خونی - مغزی در محیط کشت سلول‌های اندوتلیال مشتق شده از عروق مغز موش صحرائی را بهبود بخشیده و میزان مقاومت الکتریکی دو طرف لایه اندوتلیالی را افزایش داده و میزان نفوذپذیری این لایه را از طریق بیان کلودین-۵ کاهش می‌دهد [۴۴]. همچنین، در تحقیق دیگری Kayano و همکاران اثرات محافظت‌کننده پیتاواستاتین در جهت جلوگیری از آسیب سد خونی - مغزی ناشی از هیپرگلیسمی را در مدل کشت سلول‌های اندوتلیال مغزی جدا شده از عروق مغزی موش صحرائی بزرگ آزمایشگاهی گزارش کردند [۴۵]. نهایتاً، نتایج مطالعات دیگر نشان داده پیتاواستاتین می‌تواند میزان رگ‌زایی (آنژیوژنز) و تشکیل شبکه مویرگی سلول‌های اندوتلیال شبکه را به روشی مشابه فاکتور رشد

مشارکت و نقش نویسندگان

محمدتقی محمدی و جواد حسینی‌نژاد: ایده و طراحی مطالعه، فاطمه منصوری و محمدتقی محمدی: جمع‌آوری داده‌ها، محمدتقی محمدی و شیما شهیاد: آنالیز و تفسیر نتایج، فاطمه منصوری و محمدتقی محمدی: نگارش نسخه اول مقاله. همه نویسندگان نتایج را بررسی نموده و نسخه نهایی مقاله را تایید نمودند.

منابع

- [12] Moroi M, Nagayama D, Hara F, Saiki A, Shimizu K, Takahashi M, et al. Outcome of pitavastatin versus atorvastatin therapy in patients with hypercholesterolemia at high risk for atherosclerotic cardiovascular disease. *Int J Cardiol* 2020; 305: 139-146. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2020.01.006> PMID:31987664
- [13] Taguchi I, Iimuro S, Iwata H, Takashima H, Abe M, Amiya E, et al. High-dose versus low-dose pitavastatin in Japanese patients with stable coronary artery disease (REAL-CAD): a randomized superiority trial. *Circulation* 2018; 137: 1997-2009. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032615> PMID:29735587 PMCID:PMC5959207
- [14] Al-Ghoul WM, Kim MS, Fazal N, Azim AC, Ali A. Evidence for simvastatin anti-inflammatory actions based on quantitative analyses of NETosis and other inflammation/oxidation markers. *Results Immunol* 2014; 4: 14-22. <https://doi.org/10.1016/j.rinim.2014.03.001> PMID:24809006 PMCID:PMC4009405
- [15] Tu Q, Cao H, Zhong W, Ding B, Tang X. Atorvastatin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury through anti-inflammatory and antioxidant effects. *Neural Regen Res* 2014; 9: 268. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.128220> PMID:25206811 PMCID:PMC4146150
- [16] Faghihi N, Mohammadi MT. Anticonvulsant and antioxidant effects of pitavastatin against pentylentetrazol-induced kindling in mice. *Adv Pharm Bull* 2017; 7: 291-298. <https://doi.org/10.15171/apb.2017.035> PMID:28761832 PMCID:PMC5527244
- [17] Zhao W, Xiao ZJ, Zhao SP. The benefits and risks of statin therapy in ischemic stroke: a review of the literature. *Neurol India* 2019; 67: 983. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.266274> PMID:31512619
- [18] Christophe B, Karatela M, Sanchez J, Pucci J, Connolly ES. Statin therapy in ischemic stroke models: a meta-analysis. *Transl Stroke Res* 2020; 11: 590-600. <https://doi.org/10.1007/s12975-019-00750-7> PMID:31788761
- [19] Olmastroni E, Molari G, De Beni N, Colpani O, Galimberti F, Gazzotti M, et al. Statin use and risk of dementia or Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Eur J Prev Cardiol* 2022; 29: 804-814. <https://doi.org/10.1093/euripcc/zwab208> PMID:34871380
- [20] Yaribeygi H, Faghihi N, Mohammadi MT, Sahebkar A. Effects of atorvastatin on myocardial oxidative and nitrosative stress in diabetic rats. *Comp Clin Path* 2018; 27: 691-697. <https://doi.org/10.1007/s00580-018-2652-2>
- [21] Jafari M, Hojati V, Khaksari M, Vaezi G. Effect of simvastatin on memory disorders and Hippocampal cell death in the model of the fetal alcoholic syndrome in male rats. *Koomesh* 2022; 24: 826-834. (Persian).
- [22] Sugimoto H, Konno S, Nomoto N, Nakazora H, Murata M, Kitazono H, et al. The long-term effects of pitavastatin on blood lipids and platelet activation markers in stroke patients: impact of the homocysteine level. *PLoS One* 2014; 9: e113766. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113766> PMID:25409188 PMCID:PMC4237495
- [23] Sadeq A, Elnour AA, Farah HF, Ramadan A, Baraka MA, Don J, et al. A systematic review of randomized clinical trials on the efficacy and safety of pitavastatin. *Curr Rev Clin Exp Pharmacol* 2022. <https://doi.org/10.2174/2772432817666220531115314> PMID:35642121
- [24] Xu Y, Chen M, Xiao Q, Zhao Y, Tian J. Observation of the clinical effects of Danhong injections combined with pitavastatin on blood lipid regulation in patients with ischemic strokes complicated with lipid abnormalities. *Int J Clin Exp Med* 2019; 12: 3364-3375.
- [25] Kumagai R, Oki C, Muramatsu Y, Kurosaki R, Kato H, Araki T. Pitavastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitor, reduces
- [1] Feske SK. Ischemic Stroke. *Am J Med* 2021; 134: 1457-1464. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2021.07.027> PMID:34454905
- [2] Zhu H, Hu S, Li Y, Sun Y, Xiong X, Hu X, et al. Interleukins and Ischemic Stroke. *Front Immunol* 2022; 13: 828447. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.828447> PMID:35173738 PMCID:PMC8841354
- [3] Zhao Y, Zhang X, Chen X, Wei Y. Neuronal injuries in cerebral infarction and ischemic stroke: From mechanisms to treatment (Review). *Int J Mol Med* 2022;49. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.5070> PMID:34878154 PMCID:PMC8711586
- [4] Mohammadi R, Ramezani S, Mohammadi M, Fatemi E. The effect of Transcranial direct current stimulation (tDCS) on the lower limb function with & without Step exercise in chronic stroke patients: a randomized control clinical trial. *Koomesh* 2021; 23: 320-326. (Persian). <https://doi.org/10.52547/koomesh.23.3.320>
- [5] Wu F, Liu Z, Zhou L, Ye D, Zhu Y, Huang K, et al. Systemic immune responses after ischemic stroke: From the center to the periphery. *Front Immunol* 2022; 13: 911661. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.911661> PMID:36211352 PMCID:PMC9533176
- [6] Posada-Duque RA, Barreto GE, Cardona-Gomez GP. Protection after stroke: cellular effectors of neurovascular unit integrity. *Front Cell Neurosci* 2014; 8: 231. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00231> PMID:25177270 PMCID:PMC4132372
- [7] Qin C, Yang S, Chu YH, Zhang H, Pang XW, Chen L, et al. Correction To: Signaling pathways involved in ischemic stroke: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther* 2022; 7: 278. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01129-1> PMID:35961963 PMCID:PMC9374784
- [8] Qin C, Yang S, Chu YH, Zhang H, Pang XW, Chen L, et al. Signaling pathways involved in ischemic stroke: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther* 2022; 7: 215. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01064-1> PMID:35794095 PMCID:PMC9259607
- [9] Li X, Ma N, Xu J, Zhang Y, Yang P, Su X, et al. Targeting ferroptosis: pathological mechanism and treatment of ischemia-reperfusion injury. *Oxid Med Cell Longev* 2021; 2021: 1587922. <https://doi.org/10.1155/2021/1587922> PMID:34745412 PMCID:PMC8568519
- [10] Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai AP, Cheng YL, Cheng PW, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury. *Cell Physiol Biochem* 2018; 46: 1650-1667. <https://doi.org/10.1159/000489241> PMID:29694958
- [11] Ajoolabady A, Wang S, Kroemer G, Penninger JM, Uversky VN, Pratico D, et al. Targeting autophagy in ischemic stroke: From molecular mechanisms to clinical therapeutics. *Pharmacol Ther* 2021; 225: 107848. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107848> PMID:33823204 PMCID:PMC8263472

<https://doi.org/10.1080/01616412.2018.1447318>

PMid:29544396

[37] Matsumoto T, Yoshino S, Furuyama T, Morisaki K, Nakano K, Koga JI, et al. Pitavastatin-incorporated nanoparticles for chronic limb threatening ischemia: a phase I/IIa clinical trial. *J Atheroscler Thromb* 2022; 29: 731-746.

<https://doi.org/10.5551/jat.58941>

PMid:33907060 PMCid:PMC9135659

[38] Aoki T, Kataoka H, Ishibashi R, Nakagami H, Nozaki K, Morishita R, et al. Pitavastatin suppresses formation and progression of cerebral aneurysms through inhibition of the nuclear factor kappaB pathway. *Neurosurgery* 2009; 64: 357-365.

<https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000336764.92606.1D>

PMid:19190463

[39] Kurosaki R, Muramatsu Y, Kato H, Araki T. Protective effect of pitavastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitor, on ischemia-induced neuronal damage. *Neurol Res* 2004; 26: 684-691.

<https://doi.org/10.1179/016164104225014102>

PMid:15327760

[40] Cui X, Fu Z, Wang M, Nan X, Zhang B. Pitavastatin treatment induces neuroprotection through the BDNF-TrkB signalling pathway in cultured cerebral neurons after oxygen-glucose deprivation. *Neurol Res* 2018; 40: 391-397.

<https://doi.org/10.1080/01616412.2018.1447318>

PMid:29544396

[41] Massonnet B, Normand S, Moschitz R, Delwail A, Favot L, Garcia M, et al. Pharmacological inhibitors of the mevalonate pathway activate pro-IL-1 processing and IL-1 release by human monocytes. *Eur cytokine netw* 2009; 20: 112-120.

<https://doi.org/10.1684/ecn.2009.0162>

PMid:19825520

[42] Normand S, Massonnet B, Delwail A, Favot L, Cuisset L, Grateau G, et al. Specific increase in caspase-1 activity and secretion of IL-1 family cytokines: a putative link between mevalonate kinase deficiency and inflammation. *Eur cytokine netw* 2009; 20: 101-107.

<https://doi.org/10.1684/ecn.2009.0163>

PMid:19825518

[43] Fujimoto T, Morofuji Y, Kovac A, Erickson MA, Deli MA, Niwa M, et al. Pitavastatin ameliorates lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier dysfunction. *Biomedicines* 2021; 9: 837.

<https://doi.org/10.3390/biomedicines9070837>

PMid:34356901 PMCid:PMC8301395

[44] Morofuji Y, Nakagawa S, So G, Hiu T, Horai S, Hayashi K, et al. Pitavastatin strengthens the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol* 2010; 30: 727-735.

<https://doi.org/10.1007/s10571-010-9497-9>

PMid:20127168

[45] Kayano R, Morofuji Y, Nakagawa S, Fukuda S, Watanabe D, Ozawa H, et al. In vitro analysis of drugs that improve hyperglycemia-induced blood-brain barrier dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 503: 1885-1890.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.07.131>

PMid:30060956

[46] Li Z, Zhang J, Xue Y, He Y, Tang L, Ke M, et al. Pitavastatin stimulates retinal angiogenesis via HMG-CoA reductase-independent activation of RhoA-mediated pathways and focal adhesion. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2021; 259: 2707-2716.

<https://doi.org/10.1007/s00417-021-05328-4>

PMid:34328550

[47] Matsumoto T, Yamashita S, Yoshino S, Kurose S, Morisaki K, Nakano K, et al. Therapeutic arteriogenesis/angiogenesis for peripheral arterial disease by nanoparticle-mediated delivery of pitavastatin into vascular endothelial cells. *Ann Vasc Dis* 2020; 13: 4-12.

<https://doi.org/10.3400/avd.ra.19-00130>

PMid:32273916 PMCid:PMC7140170

hippocampal damage after transient cerebral ischemia in gerbils. *J Neural Transm (Vienna)* 2004; 111: 1103-1120.

<https://doi.org/10.1007/s00702-004-0150-y>

PMid:15338328

[26] Himeda T, Hayakawa N, Tounai H, Sakuma M, Kato H, Araki T. Alterations of interneurons of the gerbil hippocampus after transient cerebral ischemia: effect of pitavastatin. *Neuropsychopharmacology* 2005; 30: 2014-2025.

<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300798>

PMid:15970948

[27] Tounai H, Hayakawa N, Kato H, Araki T. Immunohistochemical study on distribution of NF-kappaB and p53 in gerbil hippocampus after transient cerebral ischemia: effect of pitavastatin. *Metab Brain Dis* 2007; 22: 89-104.

<https://doi.org/10.1007/s11011-006-9040-3>

PMid:17226097

[28] Wakabayashi K, Suzuki H, Fukumoto Y, Obara H, Kakuma T, Sakuma I, et al. Comorbidities associated with residual cardiovascular risk in patients with chronic coronary syndrome receiving statin therapy- subanalysis of the REAL-CAD trial. *Circ Rep* 2022; 4: 422-428.

<https://doi.org/10.1253/circrep.CR-22-0070>

PMid:36120482 PMCid:PMC9437477

[29] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; 20: 84-91.

<https://doi.org/10.1161/01.STR.20.1.84>

PMid:2643202

[30] Darabi S, Mohammadi MT. Fullereneol nanoparticles decrease ischaemia-induced brain injury and oedema through inhibition of oxidative damage and aquaporin-1 expression in ischaemic stroke. *Brain Inj* 2017; 31: 1142-1150.

<https://doi.org/10.1080/02699052.2017.1300835>

PMid:28506130

[31] Sarami Foroshani M, Sobhani ZS, Mohammadi MT, Aryafar M. Fullereneol nanoparticles decrease blood-brain barrier interruption and brain edema during cerebral ischemia-reperfusion injury probably by reduction of interleukin-6 and matrix metalloproteinase-9 transcription. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2018; 27: 3053-3065.

<https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.06.042>

PMid:30093209

[32] Rasouli Vani J, Taghi Mohammadi M, Sarami Foroshani M, Rezazade E. Evaluation of the neuroprotective and antioxidant effects of Dorema aucheri extract on cerebral ischaemia-reperfusion injury in rats. *Pharm Biol* 2019; 57: 255-262.

<https://doi.org/10.1080/13880209.2019.1597132>

PMid:30957616 PMCid:PMC6461074

[33] Prado DS, Damasceno LE, Sonogo AB, Rosa MH, Martins TV, Fonseca MD, et al. Pitavastatin ameliorates autoimmune neuroinflammation by regulating the Treg/Th17 cell balance through inhibition of mevalonate metabolism. *Int Immunopharmacol* 2021; 91: 107278.

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107278>

PMid:33341737

[34] Iqbal A, Sharma S, Sharma K, Bhavsar A, Hussain I, Iqbal MK, et al. Intranasally administered pitavastatin ameliorates pentylene tetrazol-induced neuroinflammation, oxidative stress and cognitive dysfunction. *Life Sci* 2018; 211: 172-181.

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.09.025>

PMid:30227132

[35] Matsubara S, Tanaka T, Tomari S, Fukuma K, Ishiyama H, Abe S, et al. Statin treatment can reduce incidence of early seizure in acute ischemic stroke: A propensity score analysis. *Sci Rep* 2020; 10: 1-7.

<https://doi.org/10.1038/s41598-020-58652-w>

PMid:32029801 PMCid:PMC7005175

[36] Cui X, Fu Z, Wang M, Nan X, Zhang B. Pitavastatin treatment induces neuroprotection through the BDNF-TrkB signalling pathway in cultured cerebral neurons after oxygen-glucose deprivation. *Neurol Res* 2018; 40: 391-397.

Evaluating the neuroprotective effects of pitavastatin in reperfusion injuries in the focal and transient model of cerebral ischemia in rat

Fatemeh Mansouri (M.D)¹, Mohammad Taghi Mohammadi (Ph.D)^{*2}, Shima Shahyad (Ph.D)³, Javad Hosseini Nejad (M.D)⁴

1- Student Research Committee, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2 - Department of Physiology and Medical Physics, School of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Neuroscience Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Department of Neurology, School of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Corresponding author. +98 9127713583 Mohammadi.mohammadt@yahoo.com

Received: 21 Jan 2023 ; Accepted: 28 Jun 2023

Introduction: Pitavastatin is in the statins class and is mainly used for the treatment of dyslipidemia and hypercholesterolemia. According to the anti-inflammatory, angiogenic, antioxidant, anti-apoptotic, and antiplatelet effects of pitavastatin, in the present study, the protective effects were investigated against the reperfusion injuries and edema in the animal model of local and transient cerebral ischemia.

Materials and Methods: 21 rats were assigned into three groups; sham, control ischemic, and treated ischemic groups. Brain ischemia/reperfusion was induced by 90 min middle cerebral artery occlusion (MCAO) followed by 24-hour reperfusion. Rats received pitavastatin intraperitoneally at a dose of 4 mg/kg immediately after termination of MCAO. Neurological deficit score (NDS), infarct volume, and brain swelling, as an index of edema, were assessed 24 hours after termination of MCAO.

Results: MCAO induced neurological dysfunction (3.28 ± 0.28) and brain infarction in the control ischemic group (299 ± 21 mm³) accompanied by brain swelling (11.83 ± 2.61 %). Administration of pitavastatin in the treated ischemic rats significantly reduced neurological dysfunction (1.57 ± 0.20), brain infarction (117 ± 28 mm³), and brain swelling (4.75 ± 0.80 %). Also, pitavastatin considerably decreased the mortality of rats in the treated ischemic group.

Conclusion: The findings of the present study indicated that pitavastatin, as a potent neuroprotective agent, effectively reduces reperfusion-induced brain injuries and brain edema independently of cholesterol-lowering effects in the experimental model of ischemic stroke.

Keywords: Reperfusion, Pitavastatin, Ischemic Stroke, Brain Infarction, Brain Edema