

اثر کارنوزین بر خیز مغزی و شاخص‌های بیوشیمیایی اکسیداتیو استرس در مدل 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 بیوشیمیایی 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 ۵۰۰ و ۲۵۰ mg/kg.ip بلافاصله بعد از ایجاد ایسکمی تزریق شد. خیز مغزی و میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و میزان مالون‌دی‌آلدئید ۲۴ ساعت بعد از ایسکمی با روش استاندارد و کیت اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: تجویز کارنوزین با دوز ۲۵۰ mg/kg (۰/۸۱/۵±۰/۳۶) و ۵۰۰ mg/kg (۰/۸۰/۹±۰/۳۰) باعث کاهش معنی‌دار خیز مغزی به میزان ۲۵٪ و ۴۰٪ به ترتیب در مقایسه با گروه شاهد (۰/۸۲/۵±۰/۱۶) شد (P<۰/۰۰۱). هم‌چنین، کارنوزین به‌طور معنی‌داری فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز، سوپراکسید 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

ضربه‌های مغزی است [۱، ۲]. 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].

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

مالون دی آلدئید (Malondialdehyde, MDA)، محصول پراکسیداسیون غشای 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 صحرایی به ۴ گروه ۷ تایی به ترتیب زیر تقسیم شدند. گروه ۱: 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 دوز ۲۵۰ mg/kg و ۵۰۰ mg/kg [۹، ۱۴] و بلافاصله 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 مالون دی آلدئید و FRAP (به‌عنوان شاخص آنتی‌اکسیدانت کل) در بافت مغز، ۱۸ سر موش صحرایی به ۳ گروه ۶ تایی به‌ترتیب زیر تقسیم شد. گروه ۱:

با وجود تلاش‌های زیادی که در دهه‌های گذشته صورت گرفته است، هنوز درمان موثری برای خیز مغزی و آسیب‌های نرولوژیکی ناشی از آن در کلینیک یافت نشده است [۳-۵]. 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 پس‌سکته مغزی دخالت دارند [۶]. لذا یافتن داروهایی که بتوانند مسیر مختلف مولکولی آسیب‌رسان را هم‌زمان مهار نمایند، ممکن است برای کاهش خیز مغزی و یا آسیب‌های ثانویه پس‌سکته مغزی مفید باشند.

کارنوزین یک دی‌پپتید اندوژن است که از آمینواسیدهای بتا‌آلانین و هیستیدین و با کمک آنزیم کارنوزین سینتاز 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 [۱۰، ۱۱]، 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 آسیب‌سکته 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 [۱۵-۱۱، ۹-۳]. با این وجود اثر آن بر خیز مغزی، که یکی از متغیرهای مهم تعیین‌کننده میزان آسیب‌های ثانویه پس‌سکته 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 پراکسیداز (Glutathione peroxidase, GPx) و

۱۵ دقیقه بعد از خارج کردن نخ جریان خون موضعی مغز توسط دستگاه جریان‌سنج لیزری ثبت و یادداشت 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 Matrix و 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 داخل oven 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].

$100 \times \text{وزن مرطوب نیمکره} / (\text{وزن خشک نیمکره} - \text{وزن مرطوب نیمکره}) = \text{درصد محتوای آب مغز}$

$\text{درصد وزن مرطوب نیمکره غیر ایسکمیک} - \text{درصد وزن مرطوب نیمکره ایسکمیک} = \text{درصد خیز مغز}$

اندازه‌گیری سطح فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتایون 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 ۲۰۰۰۰ G سانتریفوژ شدند. سپس از محلول رویی (Supernatant) نمونه جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های SOD و GPX و تعیین مقادیر MDA، FRAP و پروتئین استفاده شد.

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

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 دوز ۵۰۰ mg/kg (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, FRAP و مقادیر MDA به ترتیبی که در ذیل آمده است، اندازه‌گیری شد.

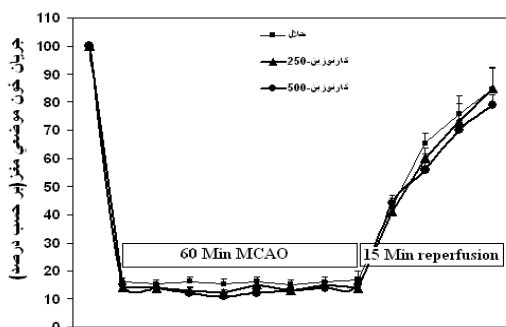
ایجاد ایسکمی مغزی موضعی. جهت ایجاد ایسکمی مغزی موضعی - موقتی، ابتداء موش‌های صحرایی با تزریق کلرال‌هیدرات (Fluka-آلمان) با دوز ۴۰۰ mg/kg ip داخل صفاقی بی‌هوش شدند. بعد از اطمینان از عمیق بودن بی‌هوشی، جهت ثبت جریان خون موضعی مغز، ابتدا پوست ناحیه گیج‌گاهی زاویه بین چشم و گوش حیوان برش داده و عضله گیج‌گاهی در محل چسبندگی به استخوان جدا شد و پس ایجاد از حفره‌ای کوچک در سطح استخوان گیج‌گاهی پروپ جریان‌سنج لیزری در این 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 شعله‌گرده 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 و تا

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 \pm انحراف معیار نمونه (SEM \pm Mean) بیان شده است. در صورتی که $P < 0.05$ 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 ($P > 0.05$ ، 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



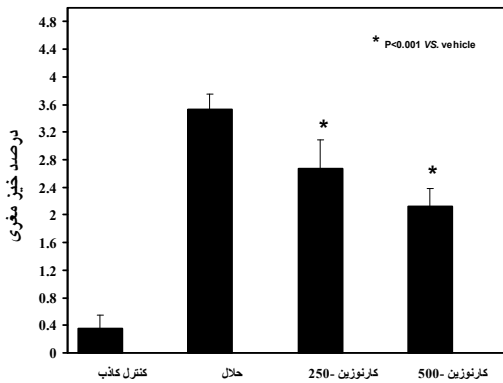
برقراری مجدد جریان خون (Reperfusion) در موش‌های صحرایی که حلال (سالین) و یا کارنوزین در دوزهای 250 mg/kg و 500 mg/kg در شروع ایسکمی دریافت کرده اند را نشان می‌دهد.

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 همونیزه 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].

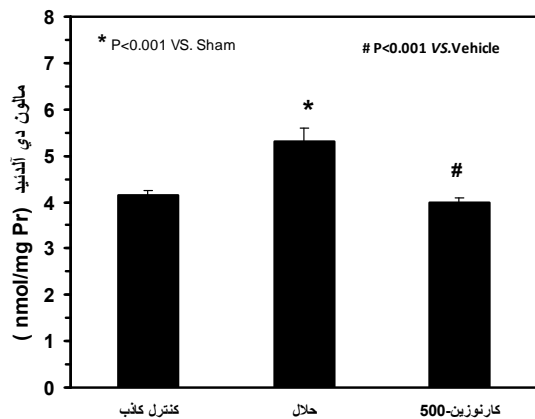
اندازه‌گیری مقدار مالون‌دی‌آلدئید در بافت مغز. از روش تیوباربیتریک اسید برای اندازه‌گیری غلظت بافتی مالون‌دی‌آلدئید استفاده شد. به‌طور خلاصه، برای اندازه‌گیری مقدار مالون‌دی‌آلدئید در بافت ایسکمیک مغز، ۲۵۰ میکرولیتر از محلول رویی نمونه اولیه را با ۱/۵ میلی‌لیتر اسیدفسفریک ۱٪ و نیم میلی‌لیتر محلول آبی تیوباربیتریک 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 و جذب 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 به مدت 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 $\mu\text{mol/mg of protein}$ بیان شد.

یابد ($P \leq 0.001$). تجویز کارنوزین با دوز ۵۰۰ mg/kg در شروع ایسکمی باعث کاهش معنی‌دار مقدار مالون‌دی‌آلدئید (4.01 ± 0.06 nmol/mg Protein) در مقایسه با گروه حلال شد (شکل ۴، $P \leq 0.001$).



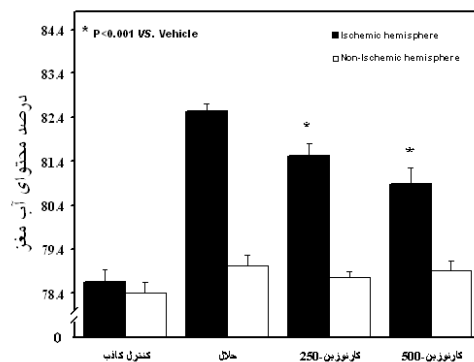
شکل ۳ در صد خیز مغز در گروه‌های کنترل کاذب (Sham)، حلال (vehicle) و کارنوزین در دوزهای ۲۵۰ mg/kg و ۵۰۰ mg/kg را بیست و چهار ساعت بعد جراحی یا ایسکمی مغزی موضعی در موش صحرایی نشان می‌دهد.



شکل ۴. مقادیر مالون دی‌آلدئید (nmol/mg Protein) در در گروه‌های کنترل کاذب (Sham)، حلال (Vehicle) و کارنوزین در دوز ۵۰۰ mg/kg 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) 0.27 ± 0.01 بود، ایجاد سکنه مغزی باعث کاهش معنی‌داری

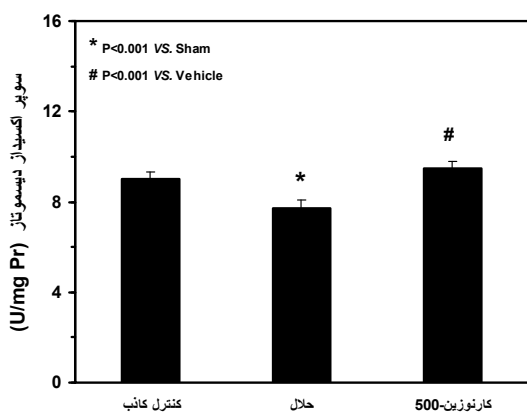
۲- تاثیر کارنوزین بر میزان خیز مغزی. محتوای آب مغز بیست و چهار ساعت بعد از جراحی در نیمکره‌های غیر ایسکمیک (چپ) در گروه کنترل کاذب ($0.78/4 \pm 0.23$ ٪)، گروه حلال ($0.79/1 \pm 0.24$ ٪) و در گروه درمان با کارنوزین با دوز ۲۵۰ mg/kg ($0.78/76 \pm 0.14$ ٪) و در دوز ۵۰۰ mg/kg ($0.78/93 \pm 0.22$ ٪) بود، که اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد ($P > 0.05$). ایجاد ایسکمی مغزی موضعی به طور معنی‌داری باعث افزایش محتوای آب مغز در نیمکره ایسکمیک ($0.82/53 \pm 0.16$ ٪) و $3/53$ درصدی خیز مغزی در مقایسه با گروه کنترل کاذب شد ($P < 0.001$ ، نمودار ۳ و ۲). تجویز کارنوزین با دوز ۲۵۰ mg/kg ($0.80/9 \pm 0.30$ ٪) 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 ($P < 0.001$ ، شکل ۳ و ۲).



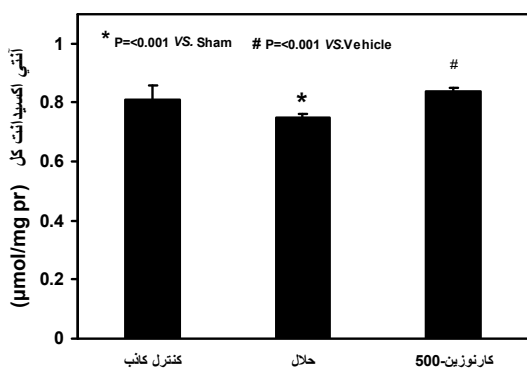
شکل ۲. در صد محتوای آب مغز در نیمکره ایسکمیک (راست) و نیمکره غیر ایسکمیک (چپ) در گروه‌های کنترل کاذب و حلال- ایسکمیک (Vehicle) و کارنوزین در دوزهای ۲۵۰ mg/kg و ۵۰۰ mg/kg را بیست و چهار ساعت بعد جراحی یا ایسکمی مغزی موضعی در موش صحرایی نشان می‌دهد.

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 (nmol/mg Protein) $4/13 \pm 0.11$ بود. ایجاد ایسکمی مغزی باعث شد، مقدار مالون‌دی‌آلدئید (nmol/mg Protein) $5/31 \pm 0.27$ به‌طور معنی‌داری افزایش

به طور معنی داری در مقایسه با گروه حلال افزایش داد (شکل ۷، $P \leq 0.001$).



شکل ۶. میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیداز 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.

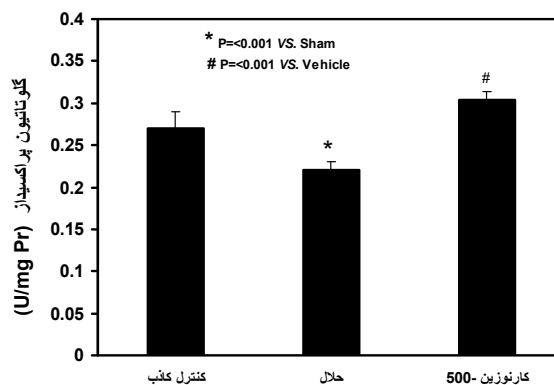


شکل ۷. میزان آنتی اکسیدانت کل (µmol/mg Protein) در گروه های کنترل کاذب (Sham) و حلال (Vehicle) و کارنوزین در دوز 500 mg/kg را بیست و چهار ساعت بعد جراحی یا ایسکمی را نشان میدهد.

بحث و نتیجه گیری

یافته اصلی این مطالعه نشان داد، کارنوزین خیز مغزی را حدود ۴۰٪ در موش های صحرایی که دچار سکته مغزی شده بودند را در مقایسه با گروه شاهد کاهش داد. به نظر می آید، این اثرات کارنوزین احتمالاً از طریق افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت اندوژن، مهار تولید رادیکال های آزاد و تضعیف اکسیداتیو استرس اعمال شده است. این یافته از آن

فعالیت بافتی آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (U/mg Protein) شد (0.22 ± 0.02). تزریق کارنوزین با دوز 500 mg/kg در شروع ایسکمی باعث افزایش معنی دار فعالیت بافتی آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (U/mg Protein) شد (شکل ۵، $P = 0.002$).



شکل ۵. میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (U/mg Protein) در 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.

میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در بافت ایسکمیک مغز بیست و چهار ساعت بعد از جراحی در گروه کنترل کاذب U/mg Protein 0.08 ± 0.06 بود، ایجاد ایسکمی مغزی باعث کاهش معنی داری فعالیت بافتی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (U/mg Protein) 0.078 ± 0.031 شد ($P \leq 0.001$). تزریق کارنوزین با دوز 500 mg/kg در شروع ایسکمی باعث افزایش معنی دار فعالیت بافتی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (U/mg Protein) 0.094 ± 0.027 شد (شکل ۶، $P \leq 0.001$).

مقدار آنتی اکسیدانت کل (Total antioxidant) در بافت ایسکمیک مغز در گروه کنترل کاذب (µmol/mg Protein) 0.08 ± 0.005 بود. ایجاد ایسکمی مغزی باعث کاهش معنی داری مقدار آنتی اکسیدانت کل در بافت ایسکمیک مغز (µmol/mg Protein) 0.075 ± 0.01 شد ($P \leq 0.001$). درمان با کارنوزین با دوز 500 mg/kg مقدار آنتی اکسیدانت کل (µmol/mg Protein) 0.084 ± 0.006 را

از سکنه مغزی شده است. مالون‌دی‌آلدئید محصول تجزیه چربی‌های غیر اشباع غشای 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 سکنه مغزی می‌شود [۲۶،۲۷]. بنابراین به نظر می‌آید حداقل بخشی از اثرات ضد خیزی کارنوزین که در این مطالعه مشاهده شده است، نتیجه افزایش فعالیت آنزیم‌های ضد اکسیداتیو اندوژن و مهار مسیرهای اکسیداتیو استرس باشد. در تایید این یافته چندین پژوهش نشان داده‌اند، کارنوزین باعث تضعیف اکسیداتیو استرس در مدل‌های مختلف سکنه‌های مغزی در حیوانات آزمایشگاهی می‌شود [۹، ۱۰، ۱۵].

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 سکنه 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 سکنه مغزی در آینده است و همین‌طور تأکید شد

جهت اهمیت دارد که بدانیم، خیز مغزی از عوارض مهم و تهدیدکننده زندگی بیماران در فاز حاد سکنه‌های 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 سکنه 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 GPX نقش 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 طریق باعث تضعیف آسیب‌های اکسیداتیو استرس و کاهش خیز مغزی می‌شود. به‌طور 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 سکنه مغزی را کاهش دهد. علت افزایش و حفظ سطح فعالیت آنزیم گلووتاتیون 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

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. *Acta Neurochir Suppl* 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, Rumbelha 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, Zahedikhorsani 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 opportunities 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 Radic Biol 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. *Acta Biol Hung* 2009; 60:137-148.
- [16] Vakili A, Nekoeian AA, Dehghani GA: L-NAME and 7-Nitroimidazole 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

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 توموری-آلفا) به‌عنوان یک فاکتور پیش‌تهایی نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی خیز پس سکته مغزی دارد [۲۹،۱۷]. مشاهدات قبلی گزارش نموده‌اند، کارنوزین اثرات ضدالتهابی دارد و می‌تواند برخی سیتوکین‌های پیش‌تهایی را مثل TNF- α را مهار نماید [۷]. اگرچه در این پژوهش میزان بیان TNF- 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 مشاهده 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 مسیره‌های آسیب‌رسان اکسیداتیو استرس باشد. نتایج مطالعه حاضر و پژوهش‌های قبلی [۳،۹-۱۱] 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 مقاله‌ها همکاری و مساعدت خانم‌ها شقایق شریفیات و مریم حدادها از دانشجویان کارشناسی ارشد

- [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 formation after stroke. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 51-70.
- [27] Kontos HA. Oxygen radicals in cerebral ischemia: the 2001 Willis lecture. *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.
- 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-Murad AKh, Mokrushin AA, Pavlinova LI. Neuroprotective properties of l-carnosine in the brain slices exposed to autolysis in the hemorrhagic stroke model in vitro. *Regul Pept* 2011; 167:65-69.
- [23] Allen CL, Bayraktutan U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic 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 Radic Biol Med* 1990; 9: 515-540.

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 stress biomarkers 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