مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره هفدهم، شماره ۶، خرداد ۱۳۹۴، صفحه ۵۷-۴۸

تاثیر حفاظتی آتورواستاتین بر میزان ضایعه مغز و آسیب نورونی در زمان ایسکمی–خونرسانی مجدد مغز در موش صحرایی

مهدی اصلانی (MSc)[۱]، محمدتقی محمدی (PhD)*[۱]، جواد رئوف سرشوری (PhD)[۲]

۱-گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله
۲-گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله

دریافت: ۹۳/۹/۲۷، اصلاح: ۹۳/۱۱/۱۵ ، پذیرش: ۹۴/۲/۱۶

خلاصه

سابقه و هدف: سکته مغزی سوّمین علّت مرگ و مهمترین عامل ناتوانی در دنیا می‌باشد. اثرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی قوی از آتورواستاتین در شرایط پاتولوژیک مختلف نشان داده شد، این مطالعه به منظور بررسی اثرات محافظتی احتمالی آتورواستاتین بر ضایعه و آسیب نورونی در مدل تجربی ایسکمی موضعی مغز در موش صحرایی انجام شد.

مواد و روشها: این مطالعه تجربی بر روی ۳۲ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار که به چهار گروه ۸ تایی تقسیم شدند، انجام شد. گروهها شامل: شاهد، کنترل ایسکمی، ایسکمی تیمارشده با آتورواستاتین قبل و بعد ایسکمی. ایسکمی مغزی با ۹۰دقیقه انسداد شریان میانی مغز و ۲۴ساعت خونرسانی مجدد می باشد. آتورواستاتین، در دوز ۴۰mg/kg، قبل از ایسکمی (۱ساعت) و بلافاصله بعد از آغاز خونرسانی مجدد داخل-صفاقی تزریق شد. ارزیابی اختلالات عصبی-حرکتی (شاخص NDS)، حجم ضایعه (رنگ آمیزی TTC) و بررسی‌های آسیب-شناسی ۲۴ساعت پس از انسداد شریان میانی مغز انجام گرفت.

یافته‌ها: انسداد شریان میانی مغز در حیوانات گروه کنترل ایسکمی به میزان قابل ملاحظه‌ای ضایعه در نیمکره راست ایجاد نمود ($۴۸۳\pm۶۹mm^3$) و میزان NDS برابر با ۳/۲۰±۰/۲۰ بود. پیش‌درمان و پس‌درمان با آتورواستاتین بطور معنی‌داری میزان ضایعه را به ترتیب ۶۸٪ و ۵۴٪ کاهش داد ($p<۰/۰۵$). همچنین میزان NDS به میزان ۲۵٪ در هر دو گروه کاهش یافت ($p<۰/۰۵$). در بررسی‌های بافت‌شناسی آتورواستاتین تعداد نورون‌های آسیب‌دیده و ائوزینوفیلی به همراه دمیلینه شدن اکسون‌ها و تخریب بافت عصبی را به میزان گسترده در نواحی ایسکمی کاهش داد.

نتیجه گیری: یافته‌های مطالعه نشان داد که آتورواستاتین بطور مؤثری آسیب‌های ایسکمی-خونرسانی مجدد مغز را کاهش داده و از تخریب نورونی و تغییرات آسیب-شناختی در ایسکمی مغز جلوگیری می‌کند.

واژه‌های کلیدی: آتورواستاتین، ایسکمی-خونرسانی مجدد، محافظت عصبی، ضایعه مغزی، تغییرات آسیب شناختی.

مقدمه

سکته مغزی به عنوان شایعترین بیماری پس از سرطان و بیماری های قلبی، عامل سوم مرگ و میر در جهان محسوب می شود (۱). گرچه شیوع سکته مغزی در دهه های اخیر بدلیل پیشرفت علم پزشکی کاهش یافته است با این حال در میان بیماری های مغز و اعصاب بزرگسالان اهمیت ویژه ای به لحاظ میزان شیوع داشته و علاوه بر مرگ، موجب بروز ناتوانی شدید در ۵۰ درصد از نجات یافته گان می شود (۲). ناحیه سکته مغزی به دو ناحیه مرکزی (Core) و محیطی (Penumbra) تقسیم می شود. در ناحیه مرکزی به دلیل کاهش شدید و یا قطع جریان خون، سلول ها دچار آسیب شده و در همان لحظات اول از بین می روند اما سلول های ناحیه محیطی به دلیل تغذیه مختصر از عروق جانبی تا مدتی زنده مانده ولی از لحاظ عملکردی غیر فعال هستند (۳). آسیب های ایسکمی مغزی از مجموعه‌ای از عوامل پیچیده پاتوفیزیولوژیکی همچون کاهش اکسیژن و مواد مورد نیاز سلولی، کاهش برداشت مواد زائد و تولید مواد مسموم کننده سلولی ناشی می شود (۴). عوامل ذکر شده سبب دپولاریزاسیون غیر قابل کنترل نورونی، آزادسازی اسیدهای آمینه تحریکی، ازدیاد سیتوکاین ها و فاکتورهای التهابی، تولید رادیکال های آزاد، ایجاد اسیدوز و افزایش کلسیم داخل سلولی می شوند که همه این موارد سبب القاء مرگ نورونی و گسترش ضایعه ناشی از ایسکمی و سکته مغزی می گردد (۶و۵). برقراری مجدد جریان خون به ناحیه ایسکمی گرچه باعث رسیدن اکسیژن، مواد متابولیکی مورد نیاز سلول ها و برداشت مواد زائد می شود ولی در مواردی ممکن است با ازدیاد تولید رادیکال های آزاد اکسیژن، نیتریک اکساید و کلسیم داخل سلولی آسیب های ناشی از

▣ این مقاله حاصل پایان نامه مهدی اصلانی دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله تهران می باشد.
* مسئول مقاله: دکتر محمد تقی محمدی
آدرس: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک. تلفن: ۰۲۱-۲۶۱۲۷۲۳۵
E-mail: Mohammadi.mohammadt@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.6.7.4]
[DOI: 10.22088/jbums.17.6.48]

ایسکمی را تشدید نماید (۷). علیرغم پیشرفت در درک پاتوفیزیولوژی سکته مغزی، انتخاب های درمانی آن محدود می باشد. گرچه اخیرا اثبات شده که فعال کننده پلاسمینوژن بافتی نوترکیب، تنها داروی مشخص برای استفاده در درمان این بیماری است اما استفاده از آن هنوز به دلیل پنجره درمانی کوتاه مدت و عوارض ناشی از خطر خونریزی آن محدود می باشد (۸).

بر این اساس شناسایی داروهای جدید برای کاهش ضایعه مغزی و سایر عوارض سکته مغزی از اهمیت ویژه ای برخوردار بوده که استفاده از استاتین ها یکی از این گزینه هاست که اخیرا نظر برخی از محققین را به خود جلب نموده است. داروهای گروه استاتین ها جزء مهار کننده های رقابتی آنزیم ۳-هیدروکسی-۳- متیل گلوتاریل کوآنزیم- آ (HMG CoA) ردوکتاز بوده که از طریق مهار کبدی این آنزیم سبب کاهش کلسترول خون می شوند. مطالعات اخیر اثرات بسیار سودمندی از این داروها در جلوگیری از اختلالات قلبی-عروقی در شرایط پاتولوژیک همچون دیابت شیرین و پرفشاری شریانی را مستقل از اثرات کاهندگی کلسترول خون گزارش کرده اند (۱۱-۹).

یافته های جدید نشان می دهند که این داروها علاوه بر خاصیت پایین آورندگی کلسترول و تری گلیسیرید خون دارای اثرات ضد التهابی، گشاد کنندگی عروقی، آنتی اکسیدانی و آنتی آپوپتوزی هستند (۱۳و۱۲). یافته های مطالعات دهه اخیر اثرات بسیار خوبی از این دسته از داروها در جلوگیری از شدت آسیب های ایجاد شده از سکته های قلبی-عروقی و مغز را نشان داده اند. طبق تحقیقات انجام شده اخیر استاتین ها به عنوان یکی از ترکیبات مؤثر در پیشگیری و درمان بیماری های عروق کرونر مطرح می باشند و مصرف این داروها در همه بیماران دچار حوادث حاد کرونری حتی بدون بالا بودن سطح لیپیدهای سرم تأثیر مثبت در بهبودی این بیماران داشته است (۱۴). در بررسی دیگری Sever و همکاران نشان دادند که آتورواستاتین از حوادث سکته مغزی یا قلبی در بیماران فشار خون بالا با سطح کلسترولی متوسط یا کمتر جلوگیری کرده است (۱۵). همچنین در مطالعه Kilic و همکاران، در مدل ایسکمی ایجاد شده بواسطه بستن شریان میانی مغز در موش سوری، رزوواستاتین به صورت داخل صفاقی با دوز mg/kg ۲۰ توانست میزان ضایعه ایجاد شده ناشی از ایسکمی را کاهش دهد (۱۶). در تحقیق دیگر Wang و همکاران اثرات بسیار خوبی از داروی آتورواستاتین به همراه سیلدنافیل در جهت کاهش پیامدهای سکته القاء شده در موش سوری را نشان دادند (۱۷). مشابه این مطالعه Kawai و همکاران در نژاد خاصی از موش صحرایی (metabolic Zucher) با سکته ایسکمی تجربی نشان دادند که استفاده ترکیبی از داروهای آمیلودیپین به همراه آتورواستاتین تاثیرات محافظت نورونی بسیار خوبی دارد (۱۸). Wang و همکاران اثرات مفید داروی سیمواستاتین به دنبال آسیب تروماتیک مغز در جهت بهبود جریان موضعی مغز، کاهش تخریب نورون های هیپوکامپ و پیامد های رفتاری بهتر را گزارش کردند (۱۹). از بررسی نتایج این مطالعات و مکانیسم آسیب و پاتوفیزیولوژی سکته مغزی می توان استنباط نمود که استفاده از داروهای گروه استاتین ها در جهت کاهش عوارض سکته مغزی در زمان بروز این اختلال می تواند مفید واقع گردد. بر این اساس مطالعه حاضر به منظور بررسی تاثیر داروی آتورواستاتین، با ماهیت آنتی اکسیدانی و ضد التهابی، بر کاهش ضایعه ناشی از آسیب ایسکمی-خونرسانی مجدد مغز و تغییرات آسیب شناسی که در حین سکته مغزی روی می دهد در مدل تجربی ایسکمی موضعی و گذرای مغز در موش صحرایی انجام شد.

مواد و روش‌ها

حیوان ها و نحوه نگهداری آنها: در این مطالعه از ۳۲ سر موش صحرایی بالغ نر نژاد ویستار (Wistar) که از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) در محدوده وزنی ۲۷۰ تا ۳۲۰ گرم خریداری شدند استفاده گردید. حیوانات قبل از مطالعه و در طی آزمایش در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی، رطوبت مناسب، درجه حرارت ^{o}C ۲۵ و با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. تمام آزمایش ها بر طبق مقررات اخلاقی کار با حیوانات، مصوب شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) انجام گردید.

القاء ایسکمی موضعی-موقتی مغزی (Transient focal cerebral ischemia): برای آماده سازی حیوان جهت ایجاد ایسکمی موقتی-موضعی مغز از روش ارائه شده توسط Longa و همکاران استفاده گردید (۲۰). در ابتدا موش های صحرایی توسط ایزوفلوران ۲/۵ درصد (Isoflurane,UK) 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 دستری آسان به شریان کاروتید مشترک و شاخه های آن (خارجی و داخلی) فراهم گردد. در گروه های ایسکمی، با بستن موقت شریان کاروتید مشترک طرف راست شکاف طریفی در شاخه کاروتید خارجی ایجاد نموده و همزمان با بستن قسمت پائین آن نخ نایلون آماده شده (شماره۰-۳) که نوک آن توسط حرارت گرد شده و سطح آن با پلی ال-لیزین پوشانده شده را از راه شکاف وارد شریان 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، مقاوت اندکی در هدایت آن ایجاد شد (۲۱). بعد از اطمینان از قرارگیری نخ آماده شده در محل مورد نظر نخ نایلون به مدت ۹۰ دقیقه در محل تثبیت شد. برای خاتمه ایسکمی و خونرسانی مجدد نخ نایلون را به آرامی از رگ در آورده و با بستن شریان خارجی زخمهای ایجاد شده در ناحیه گردن را بخیه زده و حیوان تا بهوش آمدن در محل گرم نگهداری شد. در تمام دوره آزمایش تا خاتمه بیهوشی درجه حرارت حیوان با کمک لامپ گرم کننده در محدوده ۳۸-۳۷ درجه سانتیگراد ثابت نگه داشته شد. بعد از هوشیاری کامل، حیوان را به قفس منتقل نموده و تا انجام آزمایشهای بعدی در شرایط مناسب نگهداری شد.

پروتکل و گروههای آزمایشی: حیوانات مورد نظر به صورت تصادفی در ۴ گروه به شرح زیر قرار گرفتند:

۱- گروه شاهد (Sham, n=۸): در حیوانات این گروه بعد از بیهوشی، عمل جراحی جهت انسداد شریان میانی مغز با آشکارسازی شریان کاروتید مشترک و شریانهای کاروتید خارجی و داخلی در ناحیه گردن انجام شده ولی عمل انسداد شریان میانی مغز صورت نپذیرفت. با توجه به عدم انسداد شریان میانی مغز، بعد از آماده سازی و رنگ آمیزی برشهای مغز هیچگونه علائم حاکی ایسکمی مغزی مشاهده نشد.

۲- گروه ایسکمی-خونرسانی مجدد (IR, n=۸): در حیوانات این گروه کلیه اعمال جراحی تا مرحله القاء ایسکمی مشابه گروه شاهد می باشد. القاء ایسکمی به مدت ۹۰ دقیقه دوام پیدا کرد و مرحله خونرسانی مجدد با بیرون کشیدن آهسته نخ شروع شده و بعد از ۱۵ دقیقه محل جراحی بخیه زده شده و حیوان در محل مناسب نگهداری شد. ارزیابی اختلالات عصبی-حرکتی ۲۴ ساعت بعد از شروع مرحله خونرسانی مجدد در حیواناتی که زنده می ماندند انجام گردید. سپس تحت

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.6.7.4]
[DOI: 10.22088/jbums.17.6.48]

بیهوشی عمیق، با تزریق داخل صفاقی تیوپنتال سدیم، حیوان را کشته، سر را جدا کرده، و مغز را با احتیاط کامل از جمجمه خارج نموده و جهت بررسی حجم ضایعه مغزی آماده سازی شدند.

۳- گروه پیش درمان با آتورواستاتین (IR+Pre, n=۸): حیوانات این گروه یک ساعت قبل از شروع ایسکمی آتورواستاتین (۴۰ mg/kg) به صورت داخل صفاقی دریافت کردند و مابقی پروتکل ها و جراحی جهت فیلامان گذاری برای القاء ایسکمی-خونرسانی مجدد همانند گروه کنترل ایسکمی-خونرسانی مجدد انجام گردید.

۴- گروه پس درمان با آتورواستاتین (IR+Post, n=۸): حیوانات این گروه در پایان انسداد شریان میانی مغز و بلافاصله با شروع مرحله خونرسانی مجدد آتورواستاتین (۴۰ mg/kg) به صورت داخل صفاقی دریافت کردند و مابقی پروتکل ها و جراحی جهت فیلامان گذاری برای القاء ایسکمی-خونرسانی مجدد همانند گروه کنترل ایسکمی-خونرسانی مجدد انجام گردید. داروی مورد استفاده در این تحقیق (آتورواستاتین) از شرکت داروسازی حکیم (ایران) خریداری شد. جهت آماده سازی آتورواستاتین برای تزریق، ابتدا پودر داروی خریداری شده توسط ترازوی دقیق دیجیتالی وزن شده و به صورت تازه با محلول نرمال سالین حل شد. در نهایت محلول آتورواستاتین تهیه شده به صورت تازه و پس از محاسبه مقدار تزریق (۴۰ mg/kg) برای هر حیوان به صورت داخل صفاقی تزریق انجام گردید. میزان حجم تزریق بین ۰/۵ تا یک میلی لیتر بسته به وزن و محاسبات انجام شده بود که معادل آن نرمال سالین به حیوانات گروه شاهد و کنترل ایسکمی هم تزریق گردید.

ارزیابی اختلالات عصبی-حرکتی: در حیواناتی که تا ۲۴ ساعت بعد از پایان دوره ایسکمی زنده می ماندند اختلالات عصبی-حرکتی با بکارگیری تست پنج نمره ای توسط فردی که نسبت به گروه تیمار شده آگاهی نداشت مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۲). در این تست به صورت قراردادی اختلالات عصبی-حرکتی حیوان به شرح زیر از نمره ۱ تا ۵ درجه بندی شده است. نمره ۱ به حیواناتی داده می شد، از جمله حیوانات گروه شاهد، که هیچگونه اختلال حرکتی نشان نمی دادند. نمره ۲ برای حیوانی در نظر گرفته شد که دست سمت متقابل نیمکره ایسکمی شده (دست چپ) را موقع آویزان شدن از دم خم می نمودند (حالت Flexion). نمره ۳ به حیوانی تعلق گرفت که در شروع حرکت در یک سطح صاف به سمت متقابل نیمکره ایسکمی شده (سمت چپ) می چرخید و حیوانی که رفلکس ایستادن (Righting reflex) را از دست داده بودند نمره ۴ و در نهایت نمره ۵ به حیواناتی داده شد که فاقد هر گونه حرکت خودبخودی بودند.

اندازه گیری حجم ضایعه مغزی: جهت اندازه گیری حجم ضایعه مغزی در نیمکره ایسکمی شده 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 Brain Matrix شش برش عرضی (coronal) به قطر ۲ میلیمتر تهیه و جهت رنگ آمیزی به مدت ۲۰ دقیقه در محلول ۲ درصد تری فنیل تترازولیوم کلراید (TTC) گذاشته می شدند. در این روش رنگ آمیزی، ناحیه ایسکمی شده مغز به رنگ سفید و نواحی سالم به رنگ قرمز آجری درآید. برش های رنگ شده را جهت تثبیت شدن به مدت ۲۴ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد بافر شده قرار داده و بعد از آماده سازی نهایی، از هر شش برش بطور جداگانه توسط دوربین دیجیتال (Cannon, Japan) عکس گرفته و با استفاده از کامپیوتر و نرم افزار مخصوص (NIH image Analyzer) سطح ناحیه ضایعه دیده قسمت کورتکس و استریاتوم با روش ارائه شده در مطالعات قبلی حجم ایسکمی مغز محاسبه گردید (۲۲). میزان حجم ضایعه در کورتکس و استریاتوم بر حسب میلی متر مکعب (mm^3) برای تمامی برش ها جمع و میزان ضایعه اصلاح شده (Corrected infarction volume) بر اساس فرمول زیر محاسبه شد. میزان ضایعه اصلاح شده (mm^3)=[حجم نیمکره ایسکمی نشده- (حجم نیمکره ایسکمی شده – حجم ضایعه اندازه گیری شده)]

اندازه‌گیری درصد تورم بافتی: برای اندازه‌گیری درصد تورم بافتی (Tissue swelling %) حجم نیمکره ضایعه دیده راست (RH) و نیمکره سالم چپ (LH) بر حسب mm^3 در برش های رنگ آمیزی شده تعیین و درصد تورم بافتی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (۲۲).

$$\text{درصد تورم بافتی} = \frac{\text{حجم نیمکره سالم- حجم نیمکره ضایعه دیده}}{\text{حجم نیمکره سالم}} \times ۱۰۰$$

بررسی تغییرات آسیب-شناختی در ناحیه ایسکمی مغز: در گروه شاهد ۲۴ ساعت پس از جراحی و در گروههای ایسکمی (کنترل ایسکمی و ایسکمی تیمار شده) ۲۴ ساعت پس از خونرسانی مجدد حیوانات توسط اتر بیهوش شدند. جهت مطالعه میکروسکوپی ابتدا نمونه مورد نظر (بافت مغز) به مدت دو هفته جهت تثبیت در فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت و سپس بقیه مراحل به شرح زیر انجام شد. ابتدا مراحل آماده سازی بافت و بعد قالب گیری با پارافین طبق روش های روتین انجام گردید. بعد از آن مرحله برش گیری بوسیله دستگاه میکروتوم با ضخامت ۵ میکرومتر انجام گرفت. سپس مقاطع تهیه شده در محل مورد نظر بر روی لام انتقال داده شده و برش ها با دو روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) و لوکسال فست بلو (LFB) رنگ آمیزی شدند. در نهایت بر روی برش های تهیه شده آب گیری و شفاف سازی انجام شده و فرآیند مانت کردن انجام گردید. در آخر لام های تهیه شده با دقت و توسط دستگاه میکروسکوپ نوری (Nikon) مورد ارزیابی قرار گرفته و با استفاده از دوربین مخصوص میکروسکوپ متصل به کامپیوتر (CMEX) از نقاط مورد نظر تصویر تهیه شده و شاخص های نکروز و آسیب نورونی (نورون هایی اسیدوفیل و مثلثی شکل با هسته متراکم و چروکیده) به همراه تخریب بافت عصبی (واکئولیزاسیون) مورد ارزیابی قرار گرفت.

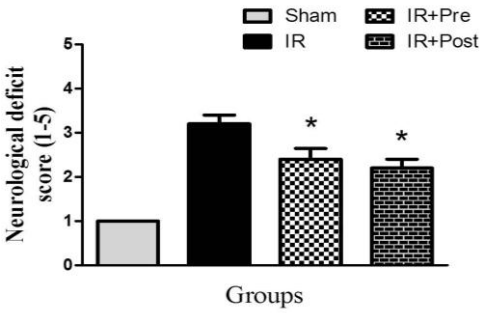
روش های آنالیز آماری: نتایج بدست آمده به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین (Means±SE) ارائه شده است. برای مقایسه میزان حجم ضایعه بدست آمده بین گروههای مختلف از روش آماری آنالیز واریانس یکطرفه (One-Way ANOVA) و از تست تعقیبی Tukey استفاده گردید. همچنین برای مقایسه داده های اختلالات عصبی-حرکتی از روش مقایسه ای غیر پارامتریک (Nonparametric) و تست آماری Mann-Whitney U استفاده شد. در تمامی مقایسه ها $p<۰/۰۵$ به عنوان اختلاف معنی دار تلقی گردید.

یافته ها

نتایج اختلالات عصبی-حرکتی: در گروه شاهد جراحی هیچگونه اختلالات عصبی-حرکتی مشاهده نشد. بنابراین میزان این پارامتر در گروه شاهد برابر با یک بود. مقادیر عددی این اختلالات برای گروه کنترل ایسکمی ۰/۲۰±۳/۲۰ از ۵ بود. درمان با داروی آتورواستاتین در هر دو گروه پیش درمان و پس درمان میزان

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.6.7.4]
[DOI: 10.22088/jbums.17.6.48]

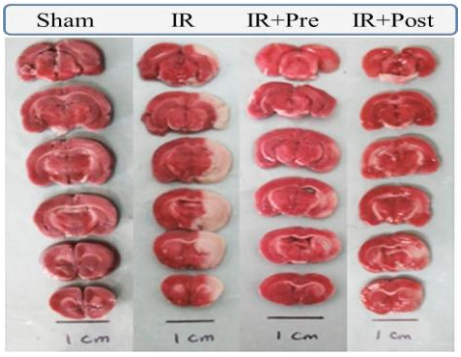
اختلالات عصبی–حرکتی را به طور معنی داری کاهش داد (p<۰/۰۵). به طوری که میزان این پارامتر در گروه پیش درمان ۲/۴۰±۰/۲۴ و گروه پس درمان ۲/۲۰±۰/۲۴ از ۵ بود که بین دو گروه درمان شده از لحاظ بررسی های آماری تفاوت معنی داری مشاهده نشد (نمودار ۱).



نمودار ۱. اختلالات عصبی–حرکتی ۲۴ ساعت بعد از شروع خونرسانی مجدد در گروههای مورد آزمایش. داده ها به صورت Means±SE نشان داده شده است

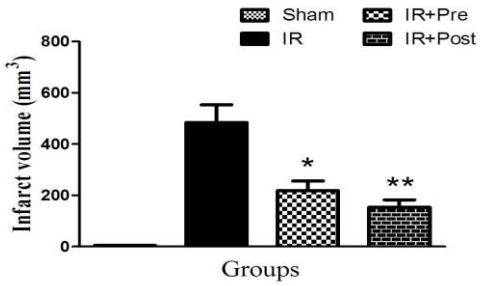
* **نشانگر تفاوت معنی دار با p<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی–خونرسانی مجدد(IR)**

نتایج حجم ضایعه مغزی: یکنواختی رنگ قرمز آجری تاییدی بر عدم وجود ضایعه بافتی در نیمکره راست و چپ گروههای شاهد و نیمکره چپ گروههای ایسکمی درمان شده و نشده در هر دو گروه می باشد. در حالیکه القاء ایسکمی–خونرسانی مجدد توانسته ضایعه نسبتا وسیعی را با رنگ سفید در قشر و زیر قشر نیمکره راست گروه ایسکمی ایجاد نماید (شکل ۱). همان طور که تصاویر نشان می دهد میزان ضایعه تشکیل شده در هر دو گروه درمان شده (قبل و بعد از ایسکمی) کاهش قابل ملاحضه ای نسبت به گروه کنترل ایسکمی دارد. مجموع ضایعه کل قشر و زیر قشر نیمکره ایسکمی در حیوانات گروه کنترل ایسکمی mm^3 ۴۸۳±۶۹ بود (نمودار ۲). دریافت آتورواستاتین به میزان mg/kg ۴۰ یک ساعت قبل از شروع ایسکمی و بلافاصله در آغاز مرحله خونرسانی مجدد مقادیر حجم ضایعه کل را به طور معنی داری کاهش داد. به طوری که میزان ضایعه کل به ترتیب mm^3 ۲۱۸±۳۷ در گروه پیش درمان (p<۰/۰۵) و mm^3 ۱۵۳±۲۸ در گروه پس درمان (p<۰/۰۱) بود. همچنین بین دو گروه درمان شده در مقایسه با هم تفاوت آماری معنی داری وجود نداشت.



شکل ۱. فوتوگراف تهیه شده از بافت مغز با رنگ آمیزی به روش TTC و ۲۴ ساعت بعد از شروع خونرسانی مجدد در گروه های مورد مطالعه

مناطق سفید رنگ نشان دهنده ناحیه ایسکمی و مناطق قرمز نشان دهنده نواحی سالم مغز است

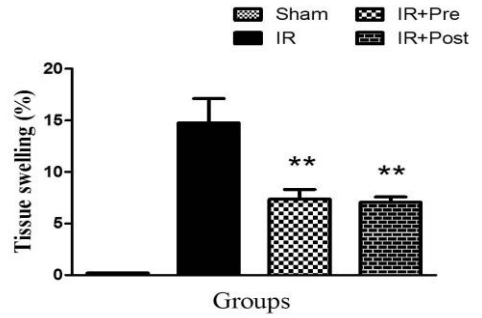


نمودار ۲. میزان حجم ضایعه نیمکره ایسکمی شده بر حسب میلیمتر مکعب (mm^3) ۲۴ ساعت بعد از شروع خونرسانی مجدد در گروههای مورد آزمایش. داده ها به صورت Means±SE نشان داده شده است

* **نشانگر تفاوت معنی دار با p<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی–خونرسانی مجدد (IR)**

** **نشانگر تفاوت معنی دار با p<۰/۰۱ در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی–خونرسانی مجدد (IR)**

نتایج درصد تورم بافتی: درصد تشکیل ادم مغزی نیمکره راست گروه شاهد که با استفاده از حجم نیمکره ها محاسبه شده بسیار کم و در حد صفر بود که درگروه کنترل ایسکمی این میزان افزایش قابل ملاحظه ای (۱۴/۷۶±۲/۳۴درصد) یافته است (نمودار۳). در گروه پیش درمان و پس درمان میزان تشکیل ادم ۷/۳۶±۱/۷۶ درصد و ۷/۵۲±۰/۵۲ درصد بود که از نظر آماری کاهش معنی داری در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی داشت (در هر دو گروه p<۰/۰۱).



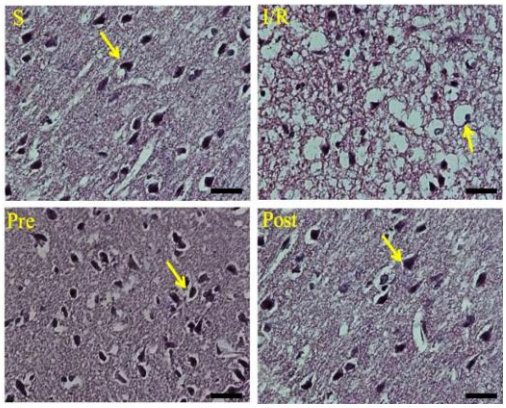
نمودار ۳. میزان درصد تورم بافتی بر حسب درصد (Tissue swelling, %) ۲۴ ساعت بعد از شروع خونرسانی مجدد در گروههای مورد آزمایش. داده ها به صورت Means±SE نشان داده شده است

** **نشانگر تفاوت معنی دار با p<۰/۰۱ در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی–خونرسانی مجدد (IR)**

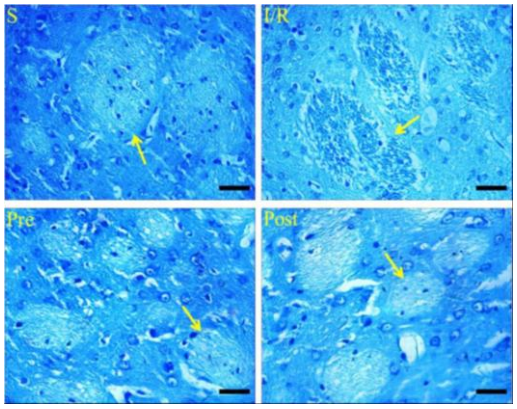
نتایج آسیب شناسی: بخش هایی از قشر نیمکره راست که تحت خونرسانی شریان میانی مغز می باشد با استفاده از هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شد. نورون ها و سایر سلول های این ناحیه به همراه بافت عصبی آن در گروه شاهد سالم و طبیعی هستند (شکل ۲) (S). این سلول ها بافتی منسجم با نظم خاصی را تشکیل داده‌اند که در بافت پارانشیم مغز (نوروپیل) قرار گرفته اند. بررسی مقاطع تهیه شده حیوانات گروه کنترل ایسکمی نشان می دهد که در مقایسه با گروه شاهد تخریب نورونی به همراه واکئولیزه شدن بافت عصبی در ناحیه قشر به مقدار زیادی صورت گرفته و چروکیدگی و متراکم بودن هسته ها نشان دهنده نورون های پیکنوتیک و نکروز شده می باشند (شکل ۲) (I/R). در صورتی که در حیوانات تیمار شده دریافت آتورواستاتین قبل و بعد از ایسکمی از آسیب های نام برده به مقدار زیادی

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.6.7.4]
[DOI: 10.22088/jbums.17.6.48]

جلوگیری کرده است به طوری که وضعیت نورون ها و بافت عصبی همانند حیوانات گروه شاهد طبیعی به نظر می رسند (شکل ۳) (Pre و Post).



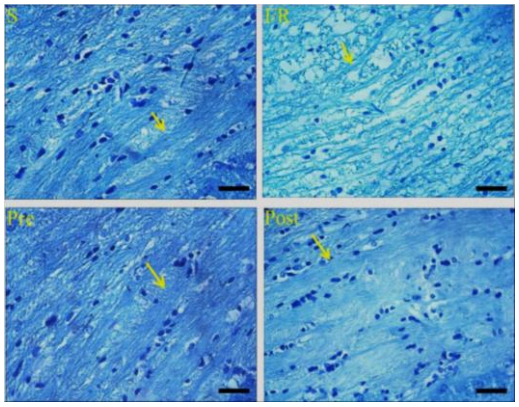
شکل ۲. تصاویر میکروسکوپ نوری تهیه شده از مقاطع عرضی ناحیه قشر در نیمکره راست مغز ۲۴ ساعت بعد از شروع خونرسانی مجدد که با روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) انجام شده است



شکل ۳. تصاویر میکروسکوپ نوری تهیه شده از مقاطع عرضی ناحیه زیر قشر در نیمکره راست مغز ۲۴ ساعت بعد از شروع خونرسانی مجدد که با روش رنگ آمیزی لوکسال فست بلو (LFB) انجام شده است

در تصاویر بدست آمده از حیوانات گروه شاهد (S) نورون ها و بافت عصبی سالم دیده می شود. در حالی که در گروه کنترل ایسکمی–خونرسانی مجدد (I/R) نورون های آسیب دیده با هسته های متراکم و چروکیده (نورون های پیکنوته و نکروتیک) به همراه واکئولیزه شدن بافت عصبی به وضوح مشاهده می شود. میزان این آسیب در گروههای پیش درمان (Pre) و پس درمان (Post) به میزان زیادی کاهش یافته است. (Scale bars= 100 µm، 400X). بخش هایی از زیر قشر و کورپوس کالوزوم نیمکره راست مغز که تحت خونرسانی شریان میانی مغز می باشند در گروههای آزمایشی با استفاده از لوکسال فست بلو رنگ آمیزی شده است (شکل ۴و۳). بافت عصبی این ناحیه درگروه شاهد به همراه رشته های عصبی آن سالم هستند (S).

در گروه کنترل ایسکمی تخریب بافت عصبی به همرا دمیلینه شدن الیاف عصبی و قطعه قطعه شدن اکسون ها در دستجات عصبی زیر قشر و ناحیه کورپوس کالوزوم به خوبی قابل مشاهده است (I/R). آتورواستاتین در حیوانات تیمار شده، قبل و بعد از ایسکمی آسیب های نام برده را به مقدار زیادی کاهش داده است. تا حدی که وضعیت الیاف عصبی و اکسون ها در حیوانات تیمار شده همانند حیوانات گروه شاهد طبیعی به نظر می رسند (Pre و Post). در تصاویر بدست آمده از حیوانات گروه شاهد (S) دسته الیاف بافت عصبی سالم دیده می شوند در حالی که در گروه کنترل ایسکمی–خونرسانی مجدد (IR) دسته الیاف بافت عصبی به همراه میلین فیبرهای عصبی آسیب دیده که میزان این آسیب در گروههای پیش درمان (Pre) و پس درمان (Post) به مقدار زیادی کاهش یافته است. (Scale bars= 100 µm، 400X). در تصاویر بدست آمده از حیوانات گروه شاهد (S) فیبرها و الیاف بافت عصبی سالم دیده می شوند. در حالی که در گروه کنترل ایسکمی–خونرسانی مجدد (I/R) دسته الیاف بافت عصبی به همراه میلین فیبرهای عصبی آسیب دیده که میزان این آسیب در گروههای پیش درمان (Pre) و پس درمان (Post) به میزان زیادی کاهش یافته است. (Scale bars= 100 µm، 400X)



شکل ۴. تصاویر میکروسکوپ نوری تهیه شده از مقاطع عرضی بافت سفید زیر قشری (کورپوس کالوزوم) در نیمکره راست مغز ۲۴ ساعت بعد از شروع خونرسانی مجدد که با روش رنگ آمیزی لوکسال فست بلو (LFB) انجام شده است

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر استفاده از داروی آتورواستاتین قبل از القاء ایسکمی و هم بعد از پایان ایسکمی (ابتدای خونرسانی مجدد) توانست میزان ضایعه ایجاد شده در نیمکره ایسکمی را به همراه اختلالات عصبی–حرکتی به میزان زیادی کاهش دهد. همچنین استفاده از این دارو قبل از شروع ایسکمی و بلافاصله بعد از آغاز خونرسانی مجدد میزان تورم بافتی، به عنوان یک شاخص مهم برای اندازه‌گیری ادم مغز، را به مقدار قابل ملاحظه ای کاهش داد. همچنین در بررسی های آسیب شناسی مشخص شد که میزان آسیب به بافت عصبی، نورون ها و فیبرهای عصبی به مقدار زیادی کاهش یافته است. بنابراین یافته های این مطالعه به خوبی اثرات مفید استفاده از آتورواستاتین در زمان سکته مغزی در جهت کاهش آسیب‌های ناشی ایسکمی–خونرسانی مجدد مغز را نشان می دهد. به دنبال ایسکمی و سکته‌های مغزی فاکتورها و سیستم های تخریبی گسترده ای در بافت مغز فعال شده که باعث مرگ نورون ها و سایر سلول های مقیم بافت عصبی می گردد (۳). افزایش تولید رادیکال های آزاد، فعال شدن سیستم التهابی، آزاد شدن نوروترانسمیترهای تحریکی و مرگ برنامه ریزی شده سلول از مهم ترین این

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.6.7.4]
[DOI: 10.22088/jbums.17.6.48]

عوامل به شمار می آیند (۴). در مطالعه حاضر القاء ایسکمی به مدت ۹۰ دقیقه توانست ضایعه گسترده ای در نواحی قشر و زیر قشر ایجاد کرده و اختلالات عصبی–حرکتی قابل ملاحظه ای در حیوانات ایسکمی ایجاد نماید که از نشانه های مهم بعد از سکته مغزی می باشد. بافت مغز به دلیل دارا بودن اسیدهای چرب غیر اشباع فراوان و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ضعیف به آسانی تحت پراکسیداسیون لیپیدها قرار می‌گیرد (۲۳و۱۱). بنابراین سلول‌های مختلف بافت مغز در حین ایسکمی به سهولت دچار آسیب شده و تغییرات آسیب شناسی گسترده ای در آنها ایجاد می‌شود. در مطالعات متعدد از نمونه‌های مغز حیوانات با مدل آزمایشگاهی سکته مغزی، تغییرات آسیب شناختی گوناگونی از جمله تشکیل نورون‌های ائوزینوفیلی (نورون‌های اسیدوفیلی با هسته پیکنوتیک، چروکیده و متراکم) و نورون‌های Ghost (نورون‌های کمتر اسیدوفیل و با هسته های تیره‌تر از طبیعی) گزارش شده است (۲۵و۲۴).

در مطالعه حاضر تغییرات آسیب شناختی ذکر شده به همراه واکئولیزه شدن بافت عصبی ۲۴ ساعت پس از القاء ایسکمی مشاهده شد. همچنین دمیلینه شدن بافت عصبی به همراه قطعه قطعه شدن اکسون ها در غلاف های موجود در زیر قشر و ناحیه کورپوس کالوزوم مشابه یافته‌های گزارش‌شده محققین در نیمکره ایسکمی مشاهده گردید. بر اساس مطالعات فعال شدن پاسخ های التهابی همچون ازدیاد سیتوکاین ها و کموکاین های پیش التهابی و در نهایت نفوذ سلول های درگیر در التهاب همچون نوتروفیل ها به ناحیه ضایعه دیده مغز، بهم خوردن تعادل یونی و تورم سلولی، اسیدوز و آزاد شدن نوروترانسمیتر های تحریکی و سمیت ناشی از تحریک بیش از حد (Hyper-excitability) بخشی از پاتوفیزیولوژی سکته مغزی بوده که باعث آسیب به نورون ها و بافت عصبی می گردد (۲۶و۴و۳). همچنین افزایش تولید رادیکال های آزاد اکسیژن در حین ایسکمی مغز بویژه در مرحله خونرسانی مجدد نقش مهمی در آسیب های ناشی از ایسکمی مغزی دارد (۲۷). از طرفی ترکیب این رادیکال ها با رادیکال های آزاد نیتروژن (نیتریک اکساید) باعث ایجاد ترکیب بسیار خطرناکی در ناحیه ایسکمی به نام پراکسی نیتریت می شود که مهم ترین عامل نکروز بافتی و تحریک مرگ برنامه ریزی شده سلولی است (۲۸). بر این اساس اگر بتوان در کنار بازگرداندن جریان خون ناحیه ایسکمی، تولید و تجمع این فاکتورهای مخرب در ناحیه ایسکمی را کاهش داد می توان از پیامد های سکته مغزی و مرگ و میر این بیماران تاحدود زیادی جلوگیری کرد (۱). علی رغم پیشرفت در درک پاتوفیزیولوژی ایسکمی و سکته مغزی انتخابهای درمانی آن محدود می باشد. استاتین ها با توجه به اثرات بسیار مفید در برخی شرایط پاتولوژیک همچون اثرات ضد التهابی، ضد استرس اکسیداتیو و مهار کننده تجمع پلاکتی مورد توجه محققین سکته مغزی قرار گرفته است (۳۰و۲۹و۱۱). در مطالعه حاضر استفاده از آتورواستاتین در هر دو گروه درمان (پیش از آغاز ایسکمی و در شروع خونرسانی مجدد) میزان حجم ضایعه مغز در گروههای ایسکمی را به میزان زیادی کاهش داده و موجب بهبود اختلالات عصبی–حرکتی گردید. در مطالعه Carloni و همکاران استفاده از سیمواستاتین که یکی دیگر از داروهای گروه استاتین است مشابه نتایج مطالعه حاضر توانست میزان آسیب ایسکمی به دلیل انسداد شریان کاروتید راست به همراه هیپوکسی را کاهش دهد (۳۱). همچنین در تحقیق دیگر Mariucci و همکاران گزارش کردند تزریق داخل وریدی پاراواستاتین میزان تشکیل ادم مغزی و میزان آسیب مغز به دنبال انسداد شریان میانی مغز را کاهش داده است (۳۲). قابل ذکر است پاراواستاتین یکی دیگر از داروهای گروه استاتین می باشد. مشابه همین یافته ها نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر نشان می دهد استفاده از آتورواستاتین میزان تورم بافت مغز، به عنوان شاخص ادم، بعد از ایسکمی–خونرسانی مجدد مغز را کاهش داده است. آتورواستاتین در مطالعه حاضر بعد از ایسکمی–خونرسانی مجدد مغز تعداد نورون‌های ائوزینوفیلی و واکئولیزه شدن بافت عصبی را مهار نموده و از دمیلینه شدن الیاف عصبی به همراه قطعه قطعه شدن اکسون ها در غلاف های موجود در زیر قشر و کورپوس کالوزوم جلوگیری نمود. با توجه به اینکه افزایش تولید رادیکال های آزاد اکسیژن و ازدیاد فاکتور های التهابی از مکانیسم های اصلی آسیب رسان در سکته و ایسکمی های مغزی بوده منطقی است که به این نکته اشاره کنیم احتمالا درمان با آتورواستاتین در مطالعه حاضر از طریق مهار مسیرهای ذکر شده باعث کاهش میزان ضایعه مغزی شده چرا که اثرات ضد استرس اکسیداتیو و ضد التهابی این دارو به خوبی اثبات شده است (۳۳و۳۰). بیشتر محققین این اثرات را به مهار تولید ماده موالونیک اسید نسبت می دهند که در مسیر سنتز ایزوپرونئید ها است. موالونیک اسید بعنوان محصول آنزیم HMG-CoA–ردوکتاز بوده و منشأ بسیاری از ایزوپرونوییدهایی است که به غیر از سنتز کلسترول نقش مهمی در وقایع داخل سلولی از قبیل آپوپتوز، التهاب، انعقاد، مهاجرت و چسبندگی لوکوسیت ها دارند (۳۵و۳۴).

بر این اساس مهار سنتز ایزوپرونوییدها توسط استاتین ها می تواند بعنوان مکانیسم های محافظتی در وقایع آسیب رسان سلولی که در زمان سکته مغزی فعال می شوند مفید واقع شود. در مطالعه Hong و همکاران آتورواستاتین به صورت زیر جلدی با کاهش فعالیت NADPH–اکسیداز از تولید آنیون سوپراکسید جلوگیری کرده است (۳۶). این آنزیم منبع غالب تولید ROS در سیستم عصبی مرکزی می باشد. همچنین نتایج مطالعه Wagner نشان می دهد آتورواستاتین از طریق افزایش فعالیت آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز اندوتلیالی و بهبود عملکرد عروقی مغز باعث افزایش جریان خون ناحیه ایسکمی شده و از چسبندگی و تجمع پلاکتی جلوگیری می کند (۳۷).

یافته‌های مطالعه حاضر نشان می دهد آتورواستاتین به طور مؤثری آسیب‌های ایسکمی–خونرسانی مجدد مغز را کاهش داده و باعث بهبود اختلالات عصبی–حرکتی بعد از سکته مغزی می شود. همچنین آتورواستاتین به عنوان یک عامل محافظت‌کننده عصبی قادر است از تخریب نورونی در نواحی ایسکمی مغز جلوگیری نماید. بر این اساس آتورواستاتین می‌تواند به عنوان یک عامل مؤثر در پیشگیری یا کاهش عوارض سکته مغزی به صورت تنها یا همراه با سایر داروهای سکته مغزی مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) بدلیل حمایتهای مالی از این تحقیق و همچنین همکاران گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.6.7.4]
[DOI: 10.22088/jbums.17.6.48]

The Protective Effects of Atorvastatin on the Brain Injury and Neuronal Damage caused by Ischemia-reperfusion in Rats

M. Aslani (BSc)[1], M.T. Mohammadi (PhD)[*1], J. Raouf Sarshoori (PhD)[2]

1.Department of Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran
2.Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 17(6); Jun 2015; PP: 48-57
Received: Dec 18th 2014, Revised: Feb 4th 2015, Accepted: May 6th 2015.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Stroke is the third main cause of mortality and the most important origin of disability in the world. Atorvastatin has been shown to have strong anti-inflammatory and antioxidant effects on various pathological conditions. This study aimed to investigate the possible protective effects of atorvastatin on neuronal injury and damage in an experimental model of focal cerebral ischemia in rats.

METHODS: This experimental study was conducted on 32 male Wistar rats, divided in four groups of eight: the control group, ischemia control group, and ischemia treated with atorvastatin (pre-treatment and post-treatment groups). Cerebral ischemia was determined as 90 minutes of middle cerebral artery occlusion, and 24 hours of reperfusion. Atorvastatin (40 mg/kg) was injected intraperitoneally one hour before ischemia induction, and immediately after the initiation of reperfusion. Moreover, evaluation of motor neuron disorders (NDS index), lesion volumes (TTC dyes) and damage recognition were performed 24 hours after the occlusion of the middle cerebral artery.

FINDINGS: In this study, the occlusion of middle cerebral artery caused significant lesions in the right hemisphere of the rats in the ischemia control group (483±69 mm^3), with NDS of 3.20±0.20. Use of atorvastatin in the pre- and post-treatment ischemia groups significantly reduced lesion volumes to 68% and 54%, respectively ($P<0.05$). In addition, NDS reduced by 25% in both treatment groups ($P<0.05$). In histological investigations, atorvastatin significantly decreased the number of damaged neurons and eosinophilia, as well as the demyelination of axons and destruction of nerve tissues in the ischemic areas of the brain.

CONCLUSION: According to the results of this study, atorvastatin could effectively reduce the brain damage caused by ischemia-reperfusion, while preventing neuronal destruction and pathological changes of the brain during ischemia.

KEY WORDS: *Atorvastatin, Ischemia-Reperfusion, Neuroprotective, Brain Injury, Pathological Changes.*

Please cite this article as follows:

Aslani M, Mohammadi MT, Raouf Sarshoori J. The Protective Effects of Atorvastatin on the Brain Injury and Neuronal Damage caused by Ischemia-reperfusion in Rats.J Babol Univ Med Sci. 2015;17(6):48-57.

[*]Corresponding Author: Mohammad Taghi Mohammadi (PhD)
Address: Department of Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran
Tel: +98 21 26127235
Email: Mohammadi.mohammadt@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.6.7.4]
[DOI: 10.22088/jbums.17.6.48]

References

1.Balami JS, Chen RL, Grunwald IQ, Buchan AM. Neurological complications of acute ischaemic stroke. Lancet Neurol. 2011;10(4):357-71.

2.Lawrence ES, Coshall C, Dundas R, Stewart J, Rudd AG, Howard R, et al. Estimates of the prevalence of acute stroke impairments and disability in a multiethnic population. Stroke. 2001;32(6):1279-84.

3.Deb P, Sharma S, Hassan KM. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. Pathophysiology. 2010;17(3):197-218.

4.Posada-Duque RA, Barreto GE, Cardona-Gomez GP. Protection after stroke: cellular effectors of neurovascular unit integrity. Front Cell Neurosci. 2014;8:231.

5.Fagan SC, Hess DC, Hohnadel EJ, Pollock DM, Ergul A. Targets for vascular protection after acute ischemic stroke. Stroke. 2004;35(9):2220-5.

6.Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. Trends Neurosci. 1999;22(9):391-7.

7.Maier CM, Hsieh L, Crandall T, Narasimhan P, Chan PH. A new approach for the investigation of reperfusion-related brain injury. Biochem Soc Trans. 2006;34(Pt 6):1366-9.

8.Cui L, Zhang X, Yang R, Wang L, Liu L, Li M, et al. Neuroprotection of early and short-time applying atorvastatin in the acute phase of cerebral ischemia: down-regulated 12/15-LOX, p38MAPK and cPLA2 expression, ameliorated BBB permeability. Brain Res. 2010;1325:164-73.

9.Law MR, Wald NJ, Rudnicka AR. Quantifying effect of statins on low density lipoprotein cholesterol, ischaemic heart disease, and stroke: Systematic review and meta-analysis. BMJ. 2003;326(7404):1423.

10.Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, et al. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels. JAMA. 1998;279(20):1615-22.

11.Mohammadi MT, Amini R, Jahanbakhsh Z, Shekarforoush S. Effects of atorvastatin on the hypertension-induced oxidative stress in the rat brain. Iran Biomed J. 2013;17(3):152-7.

12.Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks FM, Moye LA, Goldman S, et al. Pravastatin and risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Circulation. 1998;98(9):839-44.

13.Steinberg D. Hypercholesterolemia and inflammation in atherogenesis: two sides of the same coin. Mol Nutr Food Res. 2005;49:995-8.

14.[No authors listed]. Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with heart disease: the Scandinavian Simvastatin study(4S). Lancet. 1994;344(8934):1383-9.

15.Sever PS, Dahlöf B, Poulter NR, Wedel H, Beevers G, Caulfield M,et al. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomized controlled trial. Lancet. 2003;361(9364):1149-58.

16.Kilic U, Bassetti CL, Kilic E, Xing H, Wang Z, Hermann DM. Post-ischemic delivery of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor rosuvastatin protects against focal cerebral ischemia in mice via inhibition of extracellular-regulated kinase-1/-2. Neuroscience. 2005;134(3):901-6.

17.Wang QM, Wei Y, Zheng Y, Waeber C. Efficacy of combined atorvastatin and sildenafil in promoting recovery after ischemic stroke in mice. Am J Phys Med Rehabil. 2013;92(2):143-50.

18.Kawai H, Deguchi S, Deguchi K, Yamashita T, Ohta Y, Omote Y, et al. Protection against ischemic stroke damage by synergistic treatment with amlodipine plus atorvastatin in Zucker metabolic rat. Brain Res. 2011;1382:308-14.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.6.7.4]
[DOI: 10.22088/jbums.17.6.48]

19.Wang H, Lynch JR, Song P, Yang HJ, Yates RB, Mace B, et al. Simvastatin and atorvastatin improve behavioral outcome, reduce hippocampal degeneration, and improve cerebral blood flow after experimental traumatic brain injury. Exp Neurol. 2007;206(1):59-69.

20.Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke. 1989;20(1):84-91.

21.Mohammadi MT, Dehghani GA. Evaluation of cerebral blood flow autoregulation during early phase of reperfusion in rat model of transient focal ischemia. J Babol Univ Med Sci. 2014;16(6):50-6. [In Persian]

22.Mohammadi MT, Shid-Moosavi SM, Dehghani GA. Contribution of nitric oxide synthase (NOS) in blood-brain barrier disruption during acute focal cerebral ischemia in normal rat. Pathophysiology. 2012;19(1):13-20.

23.Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(1):44-84.

24.Yan BC, Ohk TG, Ahn JH, Park JH, Chen BH, Lee JC, et al. Differences in neuronal damage and gliosis in the hippocampus between young and adult gerbils induced by long duration of transient cerebral ischemia. J Neurol Sci. 2014;337(1-2):129-36.

25.Lee JC, Ahn JH, Lee DH, Yan BC, Park JH, Kim IH, et al. Neuronal damage and gliosis in the somatosensory cortex induced by various durations of transient cerebral ischemia in gerbils. Brain Res. 2013;1510:78-88.

26.Lee S, Chu HX, Kim HA, Real NC, Sharif S, Fleming SB, et al. Effect of a Broad-Specificity Chemokine-Binding Protein on Brain Leukocyte Infiltration and Infarct Development. Stroke. 2015;46(2):537-44.

27.Bozkurt AA, Mustafa G, Tarik A, Adile O, Murat SH, Mesut K, et al. Syringaldehyde exerts neuroprotective effect on cerebral ischemia injury in rats through anti-oxidative and anti-apoptotic properties. Neural Regen Res. 2014;9(21):1884-90.

28.Korkach Iu P, Rudyk OV, Kotsiuruba AV, Prysiazhna OD, Sahach VF. The role of nitric oxide and superoxide synthesis in protective mechanism of ecdysterone in the heart mitochondria of rats with streptozotocin-induced diabetes. Fiziol Zh. 2007;53(5):22-8.

29.Profumo E, Buttari B, Saso L, Rigano R. Pleiotropic effects of statins in atherosclerotic disease: focus on the antioxidant activity of atorvastatin. Curr Top Med Chem. 2014;14(22):2542-51.

30.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.

31.Carloni S, Girelli S, Buonocore G, Longini M, Balduini W. Simvastatin acutely reduces ischemic brain damage in the immature rat via Akt and CREB activation. Exp Neurol. 2009;220(1):82-9.

32.Mariucci G, Taha E, Tantucci M, Spaccatini C, Tozzi A, Ambrosini MV. Intravenous administration of pravastatin immediately after middle cerebral artery occlusion reduces cerebral oedema in spontaneously hypertensive rats. Eur J Pharmacol. 2011;660(2-3):381-6.

33.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(3):268-75.

34.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(3):112-20.

35.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(3):101-7.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.6.7.4]
[DOI: 10.22088/jbums.17.6.48]

36.Hong H, Zeng JS, Kreulen DL, Kaufman DI, Chen AF. Atorvastatin protects against cerebral infarction via inhibition of NADPH oxidase-derived superoxide in ischemic stroke. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006;291(5):H2210-5.

37.Wagner AH, Kohler T, Ruckschloss U, Just I, Hecker M. Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20(1):61-9.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.6.7.4]
[DOI: 10.22088/jbums.17.6.48]