

بررسی اثر پیش درمان اریتروپویتین بر محتوای آب بافتی مغز به دنبال ایسکمی مغزی در موش صحرایی نر با مدل انسداد شریان مغزی - میانی

دکتر محمدرضا بیگدلی^۱، دکتر حسین مصطفوی^۲، راهله غلام زاده^۳، دکتر مهدی اسکندری^۴

نویسنده‌ی مسوول: گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان mehdiesk@zums.ac.ir

دریافت: ۹۴/۸/۶ پذیرش: ۹۴/۱۱/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: یکی از عوارض عمده‌ی ایسکمی مغزی، افزایش محتوای آب بافتی در مغز است که باعث افزایش مرگ و میر می‌شود. اخیراً استراتژی‌های درمانی بر مکانیسم‌های پیش شرطی سازی دارویی متمرکز شده‌اند. اریتروپویتین یک هورمون گلیکوپروتئینی است که اثر ضد التهابی و آنتی اکسیدانی آن را در مغز تایید شده و ممکن است در کاهش ادم مغزی موثر باشد.

روش بررسی: موش‌های صحرایی نر ویستار به ۵ گروه ۶ تایی شامل: شم، کنترل، ۳ گروه پیش درمان تقسیم شدند. گروه‌های پیش درمان شامل تک دوز (۰/۵، ساعت قبل از القای سکته)، دو دوز (۰/۵ و ۴۸ ساعت قبل از القای سکته) و سه دوز (۰/۵، ۴۸ و ۹۶ ساعت قبل از القای سکته) بودند که ۱۰۰۰ واحد بر کیلوگرم اریتروپویتین را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. ۰/۵ ساعت بعد از آخرین تزریق، حیوانات به مدت ۶۰ دقیقه تحت ایسکمی مغزی با مدل انسداد شریان مغزی - میانی قرار گرفتند و ۲۴ ساعت بعد از برقراری مجدد جریان خون، از لحاظ محتوای آب بافتی مغز، هموگلوبین و هماتوکریت بررسی شدند.

یافته‌ها: محتوای آب بافتی مغز در گروه پیش درمان دریافت کننده‌ی اریتروپویتین با دوز کمتر، به‌طور معناداری کاهش یافت اما در گروه‌های پیش درمان دریافت کننده دارو با دوز بیشتر افزایش معنادار نشان داد. همچنین میزان هموگلوبین و هماتوکریت در گروه‌های پیش درمان نسبت به گروه کنترل افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج ما نشان داد که پیش درمان تک دوز اریتروپویتین ادم مغزی را در مدل سکته‌ی مغزی ایسکمیک در موش صحرایی کاهش می‌دهد.

واژگان کلیدی: اریتروپویتین، پیش درمان، ایسکمی مغزی، محتوای آب مغزی، انسداد شریان مغزی - میانی

مقدمه

سکته، در حال حاضر سومین علت مرگ و میر و ایجاد ناتوانی طولانی مدت در کشورهای توسعه یافته است. تعداد مردمی که سالانه دچار سکته می‌شوند، در حال افزایش است (۱). حدود ۸۰ درصد علت سکته، ایسکمی می‌باشد که در اثر

۱- دکترای فیزیولوژی، دانشیار گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

۲- دکترای علوم اعصاب، استادیار گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

۴- دکترای پزشکی، متخصص فیزیولوژی، استادیار گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

ترومبوز، آمبولی و کاهش خونرسانی سیستمیک به وجود می‌آید. سکتی ایسکمی باعث رها شدن بیش از حد اسیدآمینوهای تحریکی، فعال شدن گیرنده‌های آن‌ها، ورود کلسیم به داخل سلول و اختلالات الکتروفیزیولوژیکی - متابولیکی می‌شود. بهبود تاخیری جریان خون، در اثر فعال شدن فرآیندی به نام استرس اکسیداتیو باعث آسیب بزرگتری نسبت به آسیب اولیه می‌شود که این فرآیند منجر به اختلال در آندوتلیوم، انسداد مویرگی و آسیب در تامین اکسیژن بافتی شده که به دنبال آن شکست سد خونی - مغزی و ادم مغزی ایجاد می‌شود (۲). ادم مغزی، به عنوان افزایش غیر طبیعی در محتوای آب مغزی تعریف شده است (۳) که یک عارضه‌ی بالینی خطرناک، همراه با ۸۰ درصد مرگ و میر است (۴). مجموعه سخت با تورم پیشرونده‌ی بافت مغزی مخالفت می‌کند که منجر به افزایش فشار داخل مغزی، کاهش در جریان خون مغزی و در نهایت فتق مغزی و مرگ می‌شود. مکانیسم‌های ادم شامل دو نوع ادم سایتوتوکسیک (ادم داخل سلولی همراه با اختلال در تعادل یون‌های سلولی) و ادم وازوژنیک (ادم خارج سلولی همراه با شکست سد خونی - مغزی) است (۵ و ۶). سد خونی - مغزی، یک رابط دینامیک بین مغز و جریان خون است که مانع از نفوذ نامطلوب ترکیبات خارجی و مایع اضافی به مغز می‌شود. جامعیت این سد به وسیله‌ی اتصالات سلولی اندوتلیال شامل هر دو اتصالات سخت و اتصالات چسبنده، نگه داشته می‌شود (۷). استراتژی‌های درمانی ادم مغزی، محدود به استفاده از تجویز محلول‌های هیپراسمولار و یا برداشتن استخوان جمجمه جهت کاهش فشار روی مغز متورم می‌باشد که این روش‌ها برای ۹۰ سال گذشته بدون تغییر باقی مانده‌اند (۵). همچنین استفاده از این روش‌های درمانی دارای محدودیت می‌باشد (۴). شرایط مختلفی از جمله جراحی‌های آنوریسم، پیوند اعضا، اندرکتومی‌ها به علت کاهش جریان خون سیستمیک، مستعد کننده‌ی فرد به سکتی مغزی و پیامدهای بالینی آن مثل

ادم مغزی هستند. بنابراین یافتن روش‌های درمانی پیشگیرانه جدید جهت کاهش ادم مغزی، می‌تواند به درمان سکتی کمک کند.

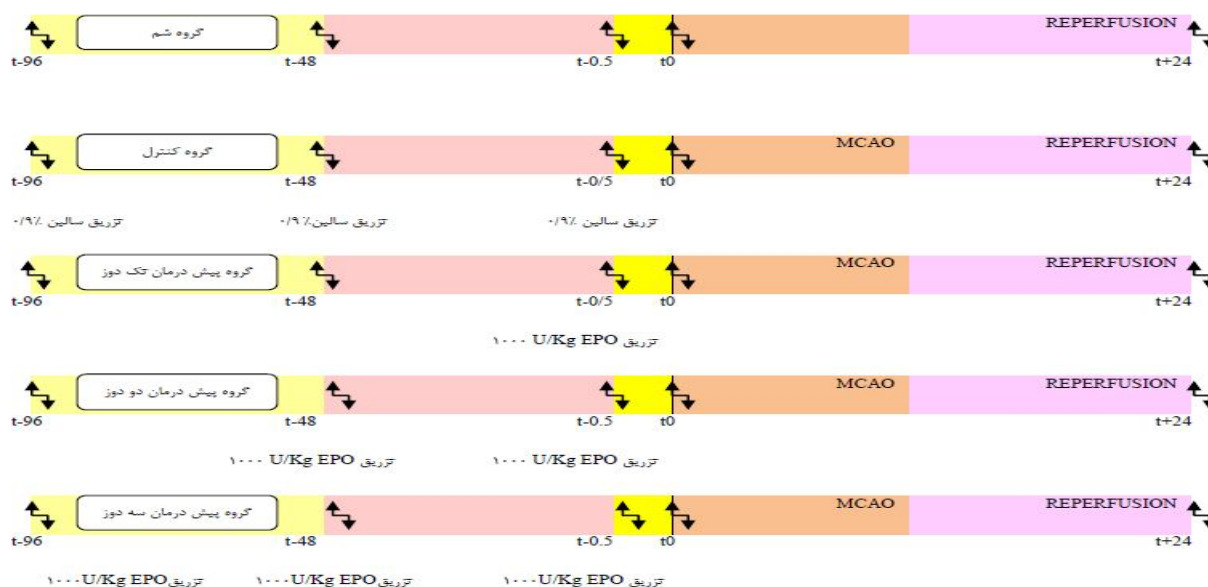
در مغز یک رخداد ایسکمیک غیر کشنده، می‌تواند تحمل در برابر ایسکمی متعاقب شدیدتر را القا کند که این پدیده، پیش شرطی سازی به ایسکمی نامیده می‌شود (۸). پیش شرطی سازی، یک پدیده درون زاد است که باعث القای پاسخ سازشی و حفاظتی در برابر آسیب ایسکمیک شدید بعدی می‌شود. به مقاومت در برابر آسیب ایسکمیک شدید، که در اثر پیش شرطی سازی به ایسکمی به وجود می‌آید، تحمل به ایسکمی می‌گویند (۲). تحمل به ایسکمی مغزی، می‌تواند در آزمایشگاه به وسیله طیفی از محرک‌های پیش شرطی سازی زیر از قبیل هیپوترمی، اکسیژن هیپر باریک، و همچنین سایتوکاین‌ها حاصل شود (۹). برخی عوامل دارویی، می‌توانند اثر مفیدی از پیش شرطی سازی ایسکمیک که پدیده پیش شرطی سازی دارویی نامیده می‌شود، تولید کنند و ممکن است یک شانس درمانی برای بافت‌های در معرض ایسکمیک - خونرسانی مجدد باشند (۱۰). پیش شرطی سازی به ایسکمیک، با تنظیم جریان خون مغزی، افزایش رگ‌زایی و پیشگیری از افزایش در نفوذپذیری سد خونی - مغزی از مغز حفاظت می‌کند (۱۱). اریتروپویتین، یک هورمون هماتوپوئیک است و محل اصلی تولید آن در زمان جنینی، کبد و در بزرگسالی، کلیه است که در دو دهه‌ی اخیر جهت درمان آنمی در بیماران استفاده شده است (۱۲). مطالعات نشان داده‌اند که اریتروپویتین و گیرنده‌های آن به وسیله‌ی ارگان‌های مختلف از جمله سلول‌های اندوتلیال محیطی، سلول‌های عضلات صاف عروقی، نورون‌ها، آستروسیت‌ها، میکروگلیاها، میوسیت‌های قلبی بیان می‌شود (۱۳). اخیراً گزارش شده است که اریتروپویتین، ممکن است به عنوان یک عامل پیش شرطی سازی دارویی، در برابر آسیب ایسکمیک - خونرسانی مجدد در بافت‌های متعدد از قبیل کلیه، قلب،

درمان در مغز یافت نشده است. لذا در این مطالعه بررسی اثر پیش درمان اریتروپویتین بر روی محتوای آب بافتی مغز به دنبال ایسکمی مغزی در موش صحرایی نر با مدل انسداد شریان مغزی - میانی با دوز ۱۰۰۰ تا ۳۰۰۰ واحد بر کیلوگرم با مدت زمان تجویز کوتاه مدت و ارتباط آن با میزان تغییر هموگلوبین و هماتوکریت، مورد هدف قرار گرفته است.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی ۳۰ راس موش صحرایی نر نژاد ویستار، با محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۳۰۰ گرم به طور تصادفی به ۵ گروه مساوی شامل گروه شم (استرس جراحی)، گروه کنترل (مدل سکته مغزی دریافت کننده سالین ۰/۹ درصد) و سه گروه پیش درمان با اریتروپویتین تقسیم شدند.

طناب نخاعی و ریه در نظر گرفته شود (۱۰). همچنین اریتروپویتین در بافت‌های مختلف اثرات ضد آپوپتوتیک، آنتی اکسیدانی و ضد التهابی نشان داده است و ممکن است از این طریق جامعیت سد خونی - مغزی را افزایش دهد (۱۴ و ۱۵). یانگ لی و همکارانش در سال ۲۰۰۷ در مطالعه شان نشان دادند که تجویز روزانه اریتروپویتین با دوز ۵۰۰۰ واحد بر کیلوگرم از ۰/۵ ساعت قبل از سکته تا سه روز بعد از ادم مغزی را کاهش داد (۷). در یک مطالعه دیگر کان لیو و همکارانش در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که تجویز تک دوز اریتروپویتین با دوز ۵۰۰۰ واحد بر کیلوگرم بلافاصله قبل از حمله ایسکمی ادم مغزی را کاهش داد (۱۶). در ارتباط با اثر پیش درمان اریتروپویتین بر محتوای آب بافتی مغز مطالعات محدودی انجام گرفته و هنوز یک حداقل دوز مطلوب جهت



شکل ۱: طراحی گروه‌های آزمایشی؛ القای سکته با مدل انسداد شریان مغزی - میانی، برقراری جریان خون بعد از ۱ ساعت و بررسی پارامترهای خونی و محتوای آب بافتی ۲۴ ساعت بعد از خون‌رسانی مجدد (Reperfusion).

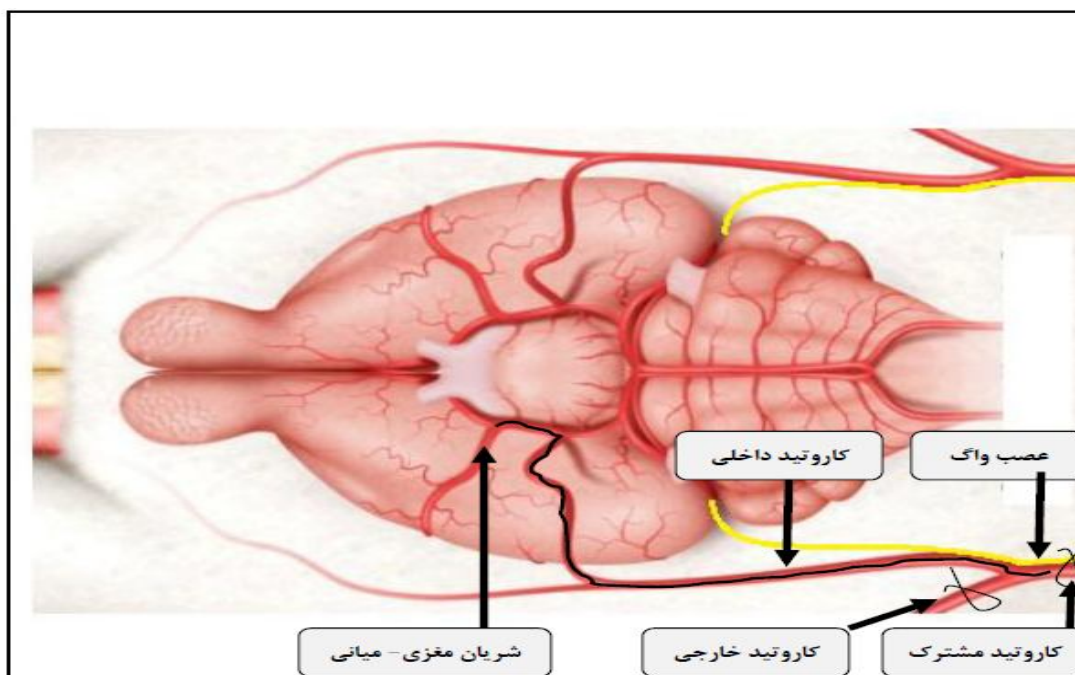
ساعت قبل) و سه دوز (۰/۵، ۴۸ و ۹۶ ساعت قبل) بودند که اریتروپویتین آلفا نو ترکیب انسانی (آمپول Eprex ۴۰۰۰

گروه‌های پیش درمان به ترتیب شامل گروه پیش درمان تک دوز (۰/۵ ساعت قبل از القای سکته)، دو دوز (۰/۵ و ۴۸

واحدی کد ۱۲۲۸۰۴۸۳۲۶ شرکت پویش دارو) را با دوز ۱۰۰۰ واحد بر کیلوگرم به صورت صفاقی قبل از القای سکته دریافت کردند. حیوانات، ۵/۰ ساعت بعد از آخرین تزریق با استفاده از داروی کلرال هیدرات (Merck آلمان کد ۱۰۲۴۲۵) بیهوش شده و سکته‌ی مغزی با استفاده از مدل انسداد شریان مغزی - میانی (Middle Cerebral Artery Occlusion= MCAO) به مدت ۶۰ دقیقه القا شد. سپس ۲۴ ساعت بعد از القای سکته حیوانات از نظر محتوای آب بافتی، میزان هموگلوبین و هماتوکریت خون مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۱). در طول دوره‌ی مطالعه، حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت نور، ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۴±۲ نگهداری شدند. این مطالعه در آزمایشگاه تحقیقات مرکزی دانشگاه علوم پزشکی زنجان مطابق با استاندارد بین المللی اخلاق کار با حیوان با تایید کمیته‌ی اخلاق دانشگاه انجام شد.

مدل القای سکته: جهت بستن شریان مغزی - میانی و القای ایسکمی، حیوان با کلرال هیدرات با دوز ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم بیهوش شده و در وضعیت خوابیده به پشت بر روی پد جراحی قرار داده شد. جراحی مدل MCAO مطابق با روش لونگا (Longa) و همکاری انجام شد. بعد از استریل کردن محل عمل با الکل ۷۰ درصد، در امتداد ستون مهره‌ها شکافی در خط میانی گردن در سمت راست، به طول ۲ سانتی متر ایجاد شد. سپس با کنار زدن بافت بزاقی و عضله‌ی استرنوئید، شریان کاروتید مشترک (Common Carotid Artery= CCA) نمایان شد. این شریان از عصب واگ جدا شد. سپس شریان کاروتید داخلی (Internal Carotid Artery= ICA) و خارجی

(External Carotid Artery= ECA) مشخص شده، شریان کاروتید خارجی از قسمت انتهایی و شریان کاروتید مشترک از قسمت ابتدایی با عبور نخ به دور آن‌ها بسته شد (شکل ۲). در این حالت شریان کاروتید داخلی، تنها شاخه خارج مجموعه‌ای کاروتید مشترک بود که نیمکره‌ی راست را خونرسانی می‌کرد. سپس با استفاده از یک کلیپس عروقی، قسمت انتهایی کاروتید مشترک مسدود شد. با استفاده از یک قیچی میکروسرجری، بر روی کاروتید مشترک، بین انسداد در محل انتهایی کاروتید مشترک و کلیپس عروقی یک شکاف میکرو ایجاد گردید. در مرحله‌ی بعد، یک نخ بخیه نایلون تک فیلامنتی ۰-۳ به طول ۵ سانتی متر که نوک آن با شعله از قبل گرد شده بود و در محل ۲ سانتی متر، با استفاده از رنگ علامت‌گذاری شده بود از محل سوراخ ایجاد شده بر روی کاروتید مشترک عبور داده شد و با استفاده از یک نخ، در محل ورود به رگ گره زده شد تا ثابت بماند. در مرحله‌ی بعد کلیپس عروقی، از انتهای کاروتید مشترک برداشته شد و با استفاده از پنس، نخ به سمت جلو حرکت داده شد تا جایی که مقاومت در برابر عبور نخ ایجاد شد که در واقع همان محل جدا شدن شاخه شریان مغزی - میانی از حلقه ویس می‌باشد. نخ به مدت ۶۰ دقیقه، در محل باقی ماند و بعد از ۶۰ دقیقه، نخ آهسته به سمت عقب کشیده شده و خارج گردید و محل ورود نخ، با استفاده از یک نخ که از قبل در قسمت بالاتر ورود نخ نایلون به داخل رگ قرار گرفته بود، مسدود شد. پس از خروج نخ، جریان خون نیمکره راست از طریق حلقه ویلیس مجدد برقرار گردید (۱۷).



شکل ۲: تصویر شماتیک القای سکته با مدل MCAO؛ جداسازی عصب واگ از کاروتید مشترک و مسدود کردن قسمت انتهایی کاروتید مشترک و قسمت ابتدایی کاروتید خارجی و وارد کردن فیلامان جراحی تا محل جداسدن شریان مغزی-میانی

(وزن خشک) $= \frac{(WW-DW)}{WW} \times 100$ اندازه‌گیری ادم مغزی (۱۹ و ۱۸).

ارزیابی میزان هموگلوبین و هماتوکریت: جهت اندازه‌گیری هموگلوبین و هماتوکریت، ۲۴ ساعت بعد از القای ایسکمی حیوان بیهوش شده، پوست ناحیه شکم پس از ضد عفونی با الکل با استفاده از قیچی جراحی برداشته شد. سپس استخوان جناغ شکسته شد. بعد از رویت شدن قلب، با استفاده از سرنگ از بطن چپ خونگیری شد. نمونه‌ی خون به داخل لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد (EDTA) منتقل گردید و با استفاده از دستگاه سل کانتر شمارش شد.

روش تجزیه و تحلیل آماری: نتایج حاصل، با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶) با آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) با مقایسه میانگین‌ها و تست پشتیبان LSD آنالیز شد. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف از معیار

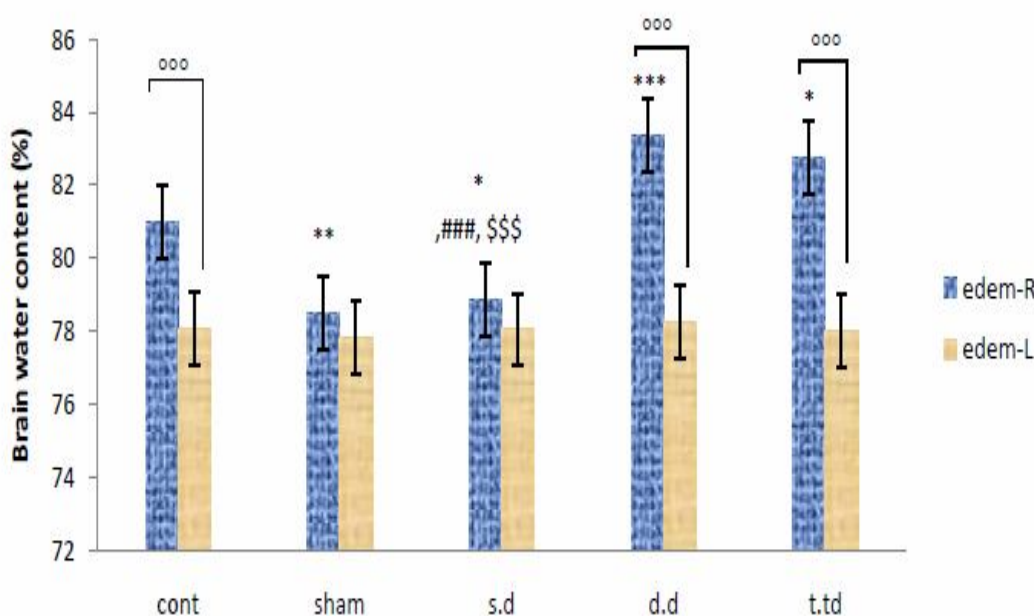
ارزیابی محتوای آب بافتی مغز: جهت اندازه‌گیری ادم مغزی، ۲۴ ساعت بعد از القای سکته حیوان با کلرال هیدرات با دوز ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم بیهوش شدند. سپس با استفاده از گیوتین، سر حیوان جدا شده و مغز بلافاصله خارج گردید. پیاز بویایی، مخچه و بصل النخاع از مغز جدا شد. سپس نیمکره‌ی راست و چپ با استفاده از تیغ از روی شیار پاریتال از هم جدا گردید. هر کدام از نیمکره‌ها به‌طور جدا گانه با ترازوی دیجیتال (Kern آلمان) با دقت دو رقم اعشار توزین شدند و وزن هر نیمکره (وزن تر) یادداشت شد. سپس بافت‌ها در داخل فور با دمای ۱۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد تا مغز خشک شود. بعد از ۲۴ ساعت هر نیمکره مجدداً به‌طور جداگانه توزین و وزن خشک یادداشت شد. سپس درصد ادم مغزی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد. WW (وزن تر)، DW

(Mean $\pm$ SEM) نشان داده شد. مقادیر $P < 0.05$ از نظر آماری معنادار تلقی گردید.

یافته ها

نمودار ۱ میزان محتوای آب بافتی مغز در نیمکره‌ی راست و چپ گروه‌های آزمایشی را نشان می‌دهد. در میزان محتوای آب بافتی نیمکره چپ در بین گروه‌های آزمایشی، اختلاف معنادار وجود نداشت که نشان دهنده‌ی عدم ایسکمی در این بخش می‌باشد. همچنین بین نیمکره‌ی راست و چپ در گروه‌های کنترل، پیش درمان دو دوز و سه دوز اختلاف معناداری از نظر محتوای آب بافتی مغز وجود داشت که نشان

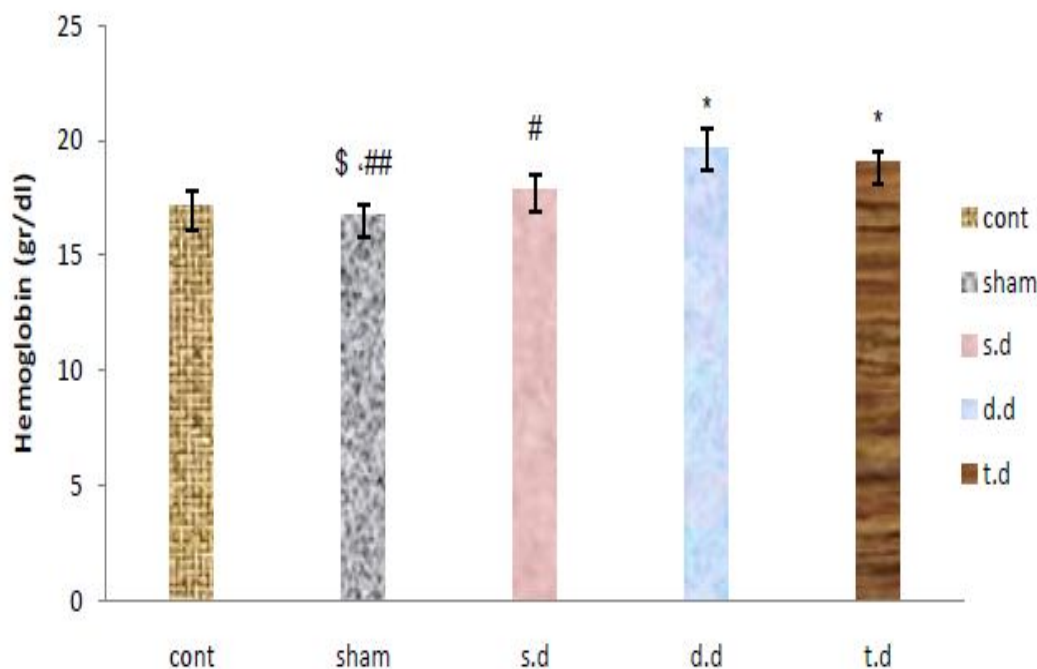
دهنده‌ی وجود ایسکمی مغزی در نیمکره‌ی راست نسبت به نیمکره‌ی چپ می‌باشد ($P < 0.000$). اثر پیش درمان اریتروپویتین بر روی محتوای آب بافتی مغز در دوزهای مختلف متغیر بود. در پیش درمان تک دوز میزان ادم مغزی در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معناداری کاهش داشت ($P < 0.05$) و همچنین محتوای آب بافتی مغز در بین نیمکره‌ی راست و چپ در این گروه اختلاف معناداری نداشت که نشان دهنده‌ی اثر گذاری درمان در این گروه می‌باشد. اریتروپویتین در گروه‌های پیش درمان دو دوز و سه دوز میزان محتوای آب بافتی مغز را نسبت به گروه کنترل به‌طور معناداری افزایش داد ($P < 0.05$) و اثر معکوس بر ادم مغزی داشت.



نمودار ۱؛ محتوای آب بافتی مغز در نیمکره‌ی راست (Edema-R) و چپ (Edema-L) گروه‌های آزمایشی؛ شام (Sham)، کنترل (Control)، پیش درمان تک دوز (Single Dose)، دو دوز (Double Dose)، سه دوز (Triple Times Dose). $p < 0.000$ *** اختلاف معنادار نیمکره‌ی راست و چپ در هر گروه $P < 0.05$ *، $P < 0.000$ **، $P = 0.005$ ** اختلاف معنادار نیمکره راست در گروه‌های مختلف با گروه کنترل. $P < 0.000$ ###، \$\$\$ اختلاف معنادار نیمکره راست با گروه پیش درمان دو دوز (###) و سه دوز (\$\$\$).

کنترل معنادار نبود اما در گروه‌های پیش درمان دو دوز و سه دوز این افزایش معنادار بود ($P < 0/05$). همچنین گروه پیش درمان دو دوز نسبت به پیش درمان تک دوز به‌طور معنادار هموگلوبین بالاتری داشت که نشان دهنده‌ی اثر گذاری بیشتر اریتروپویتین در این دوز بر روی میزان هموگلوبین می‌باشد.

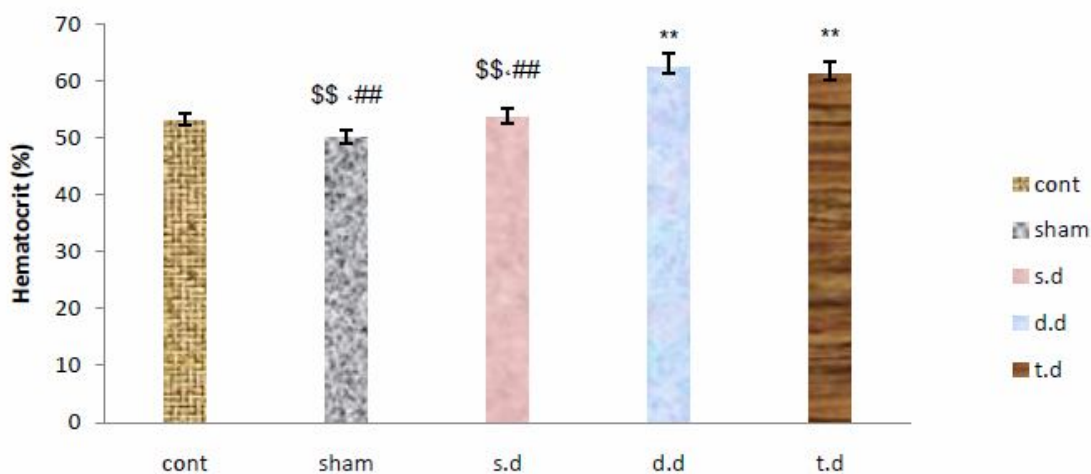
نمودار ۲ میزان هموگلوبین در گروه‌های آزمایشی را نشان می‌دهد. میزان هموگلوبین در گروه‌های پیش درمان با اریتروپویتین نسبت به گروه کنترل و شم افزایش داشت. این افزایش در گروه‌های پیش درمان با اریتروپویتین متغیر بود. در پیش درمان تک دوز افزایش هموگلوبین نسبت به گروه



نمودار ۲: میزان هموگلوبین در گروه‌های آزمایشی، شم (Sham)، کنترل (Control)، پیش درمان تک دوز (Single Dose)، دو دوز (Double Dose)، سه دوز (Triple Times Dose)، $P < 0/05$ * اختلاف معنادار با گروه کنترل، $P < 0/05$ \$، ## اختلاف معنادار با گروه پیش درمان دو دوز (#) و سه دوز (\$)، $P < 0/01$ ## اختلاف معنادار با گروه‌های پیش درمان دو دوز.

معناداری نسبت به گروه شم و کنترل افزایش داشت ($P < 0/05$). همچنین گروه پیش درمان اریتروپویتین دو دوز و سه دوز نسبت به گروه تک دوز به‌طور معنادار هماتوکریت بالاتری داشتند ($P < 0/05$).

نمودار ۳ میزان هماتوکریت در گروه‌های آزمایشی را نشان می‌دهد. میزان هماتوکریت در گروه‌های پیش درمان اریتروپویتین نسبت به گروه شم و کنترل افزایش داشت که این افزایش در گروه پیش درمان تک دوز معنادار نبود اما در گروه پیش درمان دو دوز و سه دوز میزان هماتوکریت به‌طور



نمودار ۳. میزان هماتوکریت در گروه‌های آزمایشی: شام (Sham)، کنترل (Control)، پیش درمان تک دوز (Single Dose)، دو دوز (Double Dose)، سه دوز (Triple Times Dose) $P < 0.01$ ** اختلاف معنادار با گروه کنترل، $P < 0.01$ \$\$, ## اختلاف معنادار با گروه پیش درمان دو دوز (##) و سه دوز (\$\$).

بحث

مطالعه‌ی حاضر نشان داد که اریتروپویتین به صورت تک دوز با دوز ۱۰۰۰ واحد بر کیلوگرم در ۳۰ دقیقه قبل از سکت، میزان محتوای آب بافتی مغز را در مدل تجربی سکتی مغزی در موش صحرایی کاهش داد. اما در پیش درمان دو دوز با دوز ۱۰۰۰ واحد بر کیلوگرم (در ۰/۵ و ۴۸ ساعت قبل) و سه دوز (در ۰/۵، ۴۸ و ۹۶ ساعت قبل) اثر معکوس بر روی محتوای آب بافتی مغز در مدل سکتی مغزی در موش صحرایی داشت و محتوای آب بافتی مغز را افزایش داد. در این مطالعه میزان هموگلوبین و هماتوکریت به دنبال درمان با اریتروپویتین در کلیه‌ی گروه‌ها افزایش یافت که تا حدودی وابسته به دوز بود. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که بین میزان افزایش هموگلوبین و هماتوکریت و میزان ادم مغزی ارتباط وجود دارد و در گروه‌های پیش درمان دو دوز و سه دوز، با افزایش معنادار هموگلوبین و هماتوکریت نسبت به گروه کنترل، ادم مغزی نیز به‌طور معناداری افزایش پیدا کرد.

مطالعات تجربی نشان داده‌اند که اریتروپویتین نوترکیب انسانی یک حفاظت کننده عصبی موثر است (۱۵). به دنبال ایسکمی کانونی در مغز، بیان پروتئین‌های اتصالات محکم کاهش می‌یابد که منجر به افزایش در نفوذپذیری سد خونی - مغزی و ادم وازوژنیک می‌گردد (۱۶). در یک مطالعه نشان داده شده است که تجویز اریتروپویتین بلافاصله قبل از حمله ایسکمی، از طریق افزایش در بیان پروتئین‌های اتصالات محکم زنولا اوکلاودین-۱، اوکلاودین و کلاودین-۵ و کاهش در فعالیت فاکتور نکروز توموری - آلفا $\text{TNF-}\alpha$ (Tumor Necrosis Factor-alpha) و فاکتور هسته‌ای کاپا $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (Necrosis Factor Kapa B)، نفوذپذیری سد خونی - مغزی را کاهش داد (۱۶). همچنین آپتوز (۲۰)، سایتوکاین‌های التهابی، نیتریک اکساید $\text{Nitric Oxide} = \text{NO}$ و فاکتور رشد عروقی VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) رها شده به دنبال ایسکمی مغزی، در شکستن مکانیکی سد خونی -

مغزی و شکل‌گیری ادم شرکت دارند (۷). در یک مطالعه نشان داده شد که تجویز وریدی اریتروپویتین نو ترکیب انسانی ۱۰ دقیقه قبل از انسداد شریان مغزی - میانی، احتمالاً به‌طور غیر مستقیم از طریق اتصال به گیرنده‌اش در سطح سلول‌های اندوتلیال مغز و فعال کردن مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی از جمله مهار انتقال NF- κ B، افزایش بیان پروتئین‌های اتصالات محکم و بهبود تعادل سیستم اکسیدانی و آنتی‌اکسیدانی، به‌طور معناداری ادم مغزی را کاهش می‌دهد. (۲۱). نتایج ما در پیش درمان تک دوز مطابق با مطالعات قبل بود و ادم مغزی را به‌طور معناداری کاهش داد. همچنین استرس اکسیداتیو، باعث فعال شدن متالوپروتئینازها از جمله متالوپروتئیناز ۲ و ۹ می‌شود. این آنزیم‌ها از طریق کاهش پروتئین‌های اتصالات محکم، نفوذپذیری سد خونی - مغزی را افزایش می‌دهند (۲۲). در یک مطالعه انکوباسیون اریتروپویتین به مدت ۲۴ ساعت با سلول‌های اندوتلیال جدا شده از مغز موش‌های سوری در محیط کشت، باعث افزایش در بیان متالوپروتئیناز ۲ و ۹ از طریق فعال کردن مسیر فسفاتیدیل اینوزیتول تری کیناز PI3K (Phosphatidyl Inositol 3 Kinase) شده است (۲۳). اما در یک مطالعه دیگر نشان داده شده که تجویز اریتروپویتین بعد از آسیب تروماتیک مغز، نفوذپذیری سد خونی - مغزی و ادم مغزی را از طریق مهار بیان متالوپروتئیناز ۲ و افزایش بیان مهارکننده آن کاهش داده است (۲۴). مطالعات نشان می‌دهند که اریتروپویتین در حالت وابسته به دوز بیان نیتریک اکساید (۲۵)، اندوتلین-۱ (۲۶) و فاکتور رشد عروقی را افزایش می‌دهد. همچنین مطالعات مختلف نشان دادند که اریتروپویتین، بر روی تولید نیتریک اکساید اندوتلیالی (eNO) اثر دوگانه دارد (۲۷). اگرچه تولید نیتریک اکساید اندوتلیالی، می‌تواند با گشاد کردن عروق باعث افزایش در خون‌رسانی به مغز شود، اما تولید بیش از حد نیتریک اکساید، منجر به آسیب مغزی می‌شود (۲۸). بنابراین ممکن است اثر اریتروپویتین بر روی افزایش بیان نیتریک

اکساید، فاکتور رشد عروقی و متالوپروتئینازها توجیه کننده‌ی نتایج منفی اریتروپویتین در دوز بالاتر بر روی ادم مغزی باشد. همچنین در این مطالعه پیش درمان اریتروپویتین هموگلوبین و هماتوکریت را افزایش داد که این افزایش در دوزهای مختلف متغیر بود. در مطالعات متعدد اثر اریتروپویتین بر روی افزایش تعداد رتیکولوسیت‌ها، میزان هموگلوبین و هماتوکریت نشان داده شده است. نگوچی و همکارانش در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که درمان با اریتروپویتین با دوز ۴۰۰ واحد بر کیلوگرم به‌صورت زیر جلدی به مدت یک هفته، به‌طور معناداری سطح هموگلوبین و هماتوکریت را افزایش می‌دهد (۲۹). سونی و همکارانش در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که درمان با اریتروپویتین با دوزهای ۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم، روزانه به مدت سه روز به‌طور معناداری سطح هماتوکریت را در حالت وابسته به دوز افزایش می‌دهد (۳۰). که نتایج ما در ارتباط با اثر اریتروپویتین بر روی هموگلوبین و هماتوکریت منطبق با مطالعات قبل بود. هورمون اریتروپویتین، در مغز استخوان به گیرنده‌ی خود بر روی سلول‌های رده اریتروئیدی مغز استخوان متصل می‌شود (۳۱). به دنبال اتصال اریتروپویتین به گیرنده خود، از طریق فسفوریلاسیون تیروزین و فعال شدن مسیرهای وابسته به PI3K از آپوپتوز سلول‌های اریتروئیدی جلوگیری می‌کند (۸). اثر اریتروپویتین بر سلول‌های اریتروئیدی، به غلظت پلاسمایی اریتروپویتین و میزان گیرنده‌های اریتروپویتینی موجود در سطح سلول نیز وابسته است. بیان گیرنده‌های اریتروپویتین، در مرحله شکل گیری واحد کلونی اریتروئیدی افزایش می‌یابند که در این مرحله حضور اریتروپویتین، برای جلوگیری از آپوپتوز لازم می‌باشد. (۳۲). مطالعات نشان داده‌اند که بین جریان خون مغزی و نفوذپذیری سد خونی مغزی پس از برقراری مجدد جریان خون، ارتباط نزدیکی وجود دارد (۷). لیو و همکارانش نشان دادند که تجویز ۵۰۰۰ واحد بر کیلوگرم اریتروپویتین از ۰/۵ ساعت قبل از القای سکته تا سه روز بعد از سکته، میزان

ادم مغزی را با افزایش در جریان خون مغزی بدون افزایش معنادر در میزان هموگلوبین و هماتوکریت بدون ایجاد عارضه کاهش می‌دهد (۱۶). علت تفاوت در نتایج مطالعه‌ی یانگ لی و همکارانش با مطالعه‌ی حاضر ممکن است ناشی از زمان متفاوت تجویز اریتروپویتین، زمان متفاوت اندازه‌گیری هموگلوبین و هماتوکریت و همچنین تفاوت در میزان پایه هماتوکریت باشد. همچنین با توجه به اینکه اریتروپویتین، تحت شرایط هیپوکسی ترشح می‌شود (۲۴) ممکن است اثرات تزریق اریتروپویتین آگزوزن با اریتروپویتین اندوزن هم افزایی شود نیز کریستف ویسنر و همکارانش در سال ۲۰۰۱ در مطالعه‌شان بر روی موش‌های ترانس ژنیک نشان دادند که افزایش در بیان اریتروپویتین به علت افزایش در میزان هماتوکریت و ویسکوزیته و در نتیجه کاهش خورسانی به مغز، حجم سکتی را افزایش می‌دهد. اگر چه مطالعات مختلف گزارش کردند که اریتروپویتین ممکن است از طریق افزایش در جریان خون مغز، باعث حفاظت از مغز به دنبال ایسکمی کانونی شود، اما از طرفی افزایش در اریتروپوئز، ممکن است باعث افزایش در ویسکوزیته خون شده و جریان خون عروق جانبی تغذیه کننده‌ی ناحیه‌ی حاشیه ایسکمی را مختل کند (۳۳). در یک مطالعه بر روی بیماران دچار ایسکمی مغزی - عروقی نشان داده شد که بین جریان خون مغز و میزان هماتوکریت رابطه‌ی معکوس وجود دارد. در هماتوکریت ۳۰ تا ۶۰ درصد، جریان خون مغز از ۶۶ تا ۲۱ میلی‌لیتر به ازای هر ۱۰۰ گرم بافت تغییر یافت. همچنین، در هماتوکریت بالای ۴۵ درصد تحویل اکسیژن به مغز کاهش یافته است (۳۴). مطالعات مختلف نشان داده اند که کاهش خورسانی به مغز، با کاهش اکسیژن و گلوکز در مغز منجر به فقدان

انرژی در سلول، اختلال عملکرد پمپ Na-K ATPas و مبادله گر Ca^{+2} شده که منجر به جذب آب و ادم می‌گردد (۳۵). همچنین کاتزو و همکارانش در سال ۲۰۱۰ در مطالعه شان بیان کردند که تزریق هموگلوبین به داخل بافت مغزی از طریق فعال سازی متالوپروتئینازها، باعث افزایش ادم مغزی می‌شود (۲۲). در کل مطالعه حاضر نشان داد که اریتروپویتین در دوز پایین با افزایش مطلوب در میزان هموگلوبین و هماتوکریت و احتمالاً برقراری تعادل در خورسانی به مغز، ادم مغزی را کاهش می‌دهد اما در دوز بالاتر به علت افزایش در میزان سلول‌های خونی و ویسکوزیته احتمالاً باعث کاهش خورسانی به مغز و تشدید استرس اکسیداتیو شده و در نتیجه اثر معکوس بر سکتی مغزی و پیامدهای بالینی آن از جمله ادم مغزی دارد. این امید است که اریتروپویتین در دوز پایین بتواند به عنوان داروی پیشگیری کننده از سکتی مغزی و پیامدهای بالینی آن در شرایط تهدید به ایسکمی مغزی به ویژه جراحی‌ها به کار رود.

نتیجه گیری

اثرات اریتروپویتین بر ادم مغزی متغیر بود. نتایج ما نشان داد که پیش درمان تک دوز اریتروپویتین ادم مغزی را در مدل سکتی مغزی ایسکمیک در موش صحرایی کاهش می‌دهد.

تقدیر و تشکر

این طرح پژوهشی حاصل پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد فیزیولوژی است که با پشتیبانی مالی دانشگاه علوم پزشکی زنجان و همکاری علمی دانشگاه شهید بهشتی انجام شده است.

References

1- Bacigaluppi M, Hermann DM. New targets of neuroprotection in ischemic stroke. *Sci W J*. 2008; 8: 698-712.

2- Bigdeli MR, Mohagheghi F. The pathophysiology of brain ischemia and ischemic preconditioning. *Zahedan J Res Med Sci*. 2014; 16: 1-5.

- 3- Manley GT, Binder DK, Papadopoulos MC, Verkman AS. New insights into water transport and edema in the central nervous system from phenotype analysis of aquaporin-4 null mice. *Neuroscience*. 2004; 129: 981-89.
- 4- Bardutzky J, Schwab S. Antiedema therapy in ischemic stroke. *Stroke*. 2007; 38: 3084-94.
- 5- Zador Z, Sitver S, Wang VT, Manley G. Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke, in Aquaporins. *Springer*. 2009; 159-70.
- 6- He Z, Wang X, Wu Y, et al. Treadmill pre-training ameliorates brain edema in ischemic stroke via down-regulation of aquaporin-4: an MRI study in rats. *PloS one*. 2014; 9: e84602.
- 7- Li Y, Lu Z-Y, Ogle M, et al., Erythropoietin prevents blood brain barrier damage induced by focal cerebral ischemia in mice. *Neurochem Res*. 2007; 32: 2132-41.
- 8- Ruscher K, Freyer D, Karsch M, et al. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. *J Neurosci*. 2002; 22: 10291-301.
- 9- Bernaudin M, Nedelec AS, Divoux DT, Mackenzie E, Petit E, Schumann-Bard P. Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002; 22: 393-403.
- 10- Sayan H, Ozacmak V H, Sen F, et al. Pharmacological preconditioning with erythropoietin reduces ischemia-reperfusion injury in the small intestine of rats. *Life Sci*. 2009; 84: 364-71.
- 11- Dave KR, Thompson JW, Neumann JT, et al. Neurovascular mechanisms of ischemia tolerance against brain injury, in vascular mechanisms in CNS trauma. *Springer*. 2014; 179-200.
- 12- Byts N, Sirén AL. Erythropoietin: a multimodal neuroprotective agent. *Exp Transl Stroke Med*. 2009; 1-4.
- 13- Joyeux-Faure M. Cellular protection by erythropoietin: new therapeutic implications?. *J Pharm Exp Ther*. 2007; 323: 759-62.
- 14- Alnaeeli M, Wang L, Piknova B, Rogers H, Li X, Noguchi CT. Erythropoietin in brain development and beyond. *Anat Res Int*. 2012; 2012: 1-6.
- 15- Azizzadeh Delshad A, Ghaini MH, Mirtahmaseb Mohamadi R. The neuroprotective effect of erythropoietin on spinal motoneurons following axotomy in neonate rats. *J Zanjan Univ Med Sci*. 2016; 103: 52-61.
- 16- Liu K, Sun T, Wang P, Liu Y-H, Zhang L-W, Xue Y-X. Effects of erythropoietin on blood-brain barrier tight junctions in ischemia-reperfusion rats. *J Mol Neurosci*. 2013; 49: 369-79.
- 17- Lin Y, Zhang JC, Fu J, et al. Hyperforin attenuates brain damage induced by transient middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats via inhibition of TRPC6 channels degradation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013; 33: 253-62.
- 18- Dahej MA, Delfan B, Meshkoholsadat MH, et al. Steroid alkaloids isolated from olive leaves

- reduces the damage caused by ischemia in rat. *Yafteh*. 2013; 1: 1-5.
- 19- Smith KJ, Bleyer AJ, Little WC, Sane DC. The cardiovascular effects of erythropoietin. *Cardiovasc Res*. 2003; 59: 538-48.
- 20- Okutan O, Turkoglu OF, Gok HB, Beskonakli E. Neuroprotective effect of erythropoietin after experimental cold injury-induced vasogenic brain edema in rats. *Surg Neurol*. 2008; 70: 498-502.
- 21- Ratilal BO, Arroja MMC, Rocha JPF, et al. Neuroprotective effects of erythropoietin pretreatment in a rodent model of transient middle cerebral artery occlusion: Laboratory investigation. *J Neurosurg*. 2014; 121: 55-62.
- 22- Katsu M, Niizuma K, Yoshioka H, Okami N, Sakata H, Chan PH. Hemoglobin-induced oxidative stress contributes to matrix metalloproteinase activation and blood-brain barrier dysfunction in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010; 30: 1939-50.
- 23- Wang L, Zhang ZG, Zhang LR, et al. Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 secreted by erythropoietin-activated endothelial cells promote neural progenitor cell migration. *The J Neurosci*. 2006; 26: 5996-6003.
- 24- Li Y, Ogle ME, Wallace GC, Lu Z Y, Yu SP, Wei L. Erythropoietin attenuates intracerebral hemorrhage by diminishing matrix metalloproteinases and maintaining blood-brain barrier integrity in mice, in cerebral hemorrhage. *Springer*. 2008; 105-12.
- 25- Nandra KK, Collino M, Rogazzo M, Fantozzi R, Patel N, Thiemermann Ch. Pharmacological preconditioning with erythropoietin attenuates the organ injury and dysfunction induced in a rat model of hemorrhagic shock. *Dis Mod & Mech*. 2013; 6: 701-9.
- 26- Vogel V, Kramer H, Ba"cker A, et al. Effects of erythropoietin on endothelin-1 synthesis and the cellular calcium messenger system in vascular endothelial cells. *Am J Hypertens*. 1997; 10: 289-96.
- 27- Beleslin-Cokic B, Cokic VP, Yu X, Weksler BB, Schechter AN, Noguchi CT. Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. *Blood*. 2004; 104: 2073-80.
- 28- G"rsoy-Özdemir Y, Bolay H, Saribas O, Dalkara T. Role of endothelial nitric oxide generation and peroxynitrite formation in reperfusion injury after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2000; 31: 1974-81.
- 29- Noguchi K, Yamashiro S, Matsuzaki M. Effect of 1-week treatment with erythropoietin on the vascular endothelial function in anaesthetized rabbits. *British J Pharmacol*. 2001; 133: 395-405.
- 30- Soni HM, Vekaria AM, Rath AC, Belemkar S, Jain MR. Use of aspirin in normalization of recombinant human erythropoietin-mediated hyper-reactivity of platelets in rats. *Indian J Pharmacol*. 2014; 46: 328-333.
- 31- Haghjo Gh, Rashtchizadeh N, Hashemzadeh J, Gharighoran M. Recombinant human erythropoietin effect on serum level activity of paraxonase enzyme, total antioxidant and lipid

- peroxidation in rat. *Urmia Med J.* 2012; 23: 283-90.
- 32- Zhang Y, Wang L, Dey S, et al. Erythropoietin action in stress response, tissue maintenance and metabolism. *Int J Mol Sci.* 2014; 15: 10296-333.
- 33- Wiessner CR, Allegrini P, Ekatodramis DR, Jewell U, Stallmach T, Gassmann M. Increased cerebral infarct volumes in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001; 21: 857-64.
- 34- Kusunoki M, Kimura K, Nakamura M, Isaka Y, Yoneda Sh, Abe H. Effects of hematocrit variations on cerebral blood flow and oxygen transport in ischemic cerebrovascular disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1981; 1: 413-17.
- 35- Deb P, Sharma S, Hassan K.M. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: an overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. *Pathophysiology.* 2010; 17: 197-218.

Pretreatment Effect of Erythropoietin on Brain Tissue Water Content after Brain Ischemia Induction by Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO) in Male Wistar Rats

Bigdeli MR¹, Mostafavi H², Gholamzadeh R², Eskandari M²

¹Dept. of Physiology, Faculty of Life Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

²Dept. of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

Corresponding Author: Eskandari M, Dept. of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan

E-mail: mehdiesk@zums.ac.ir

Received: 30 Aug 2015 **Accepted:** 2 Feb 2016

Background and Objective: One of the major side effects of cerebral ischemia is the water content enhancement in brain tissues which leads to mortality enhancement. Recently, therapeutic strategies have been focusing on preconditioning mechanisms. Erythropoietin as a glycoprotein hormone with anti-inflammatory and antioxidant effects on brain may be effective on brain edema reduction.

Materials and Methods: Male wistar rats were assigned to 5 groups of 6 in each: sham, control and three pretreatments. The pretreatment groups including single-dose (0.5 h before stroke induction), double-dose (0.5 and 48 h before stroke induction) and triple-dose (0.5, 48 and 98 h before stroke induction) received 1,000 IU/kg EPO intraperitoneally. 0.5 hour after the last injection, the animals were exposed to brain ischemia with the MCAO model for 60 minutes and then were evaluated regarding the brain water content, hemoglobin and hematocrit at 24 hours after reperfusion.

Results: Brain water content in the pretreatment group receiving EPO with a lower dose (1000 U/kg) decreased significantly but in the pretreatment group with a higher dose of the drug a significant enhancement was observed. Also, the amount of hemoglobin and hematocrit increased in the pretreatment groups in comparison with the control group.

Conclusion: Our results showed single-dose of EPO pretreatment decreased brain edema in the brain ischemic stroke model in wistar rats.

Keywords: *Erythropoietin; Pretreatment, Brain ischemia, Brain water content, Middle Cerebral Artery Occlusion*