

The Effect of Hydroxylated Fullerene Nanoparticles on Antioxidant Defense System in Brain Ischemia Rat

Shamsi Darabi¹, Mohammad Taghi Mohammadi^{1*}

¹Department of Physiology & Biophysics, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*Corresponding Author:
Mohammad Taghi Mohammadi, Department of Physiology & Biophysics, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Email:
mohammadimohammadt@bmsu.ac.ir

Received: 18 Sep, 2016

Accepted: 16 Nov, 2016

Abstract

Background and Objectives: According to the previous findings, brain ischemia attenuates the brain antioxidant defense system. This study aimed to investigate the effect of hydroxylated fullerene nanoparticle on antioxidant defense system in ischemic brain rat.

Methods: In this Experimental study, rats were divided into three groups (n=6 in each group): sham, ischemic control, and ischemic treatment group. Brain ischemia was induced by middle cerebral artery (MCA) occlusion for 90 minutes followed by a 24-hour reperfusion. Ischemic treatment animals received fullerene nanoparticles intraperitoneally at a dose of 10mg/kg immediately after the end of MCA occlusion. After 24-h reperfusion period, brain catalase and superoxide dismutase (SOD), and glutathione activities were assessed by biochemical methods. The data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey post-hoc test.

Results: The mean glutathione level and catalase and SOD activities in sham animals were $1\pm 0.18\%$, $1\pm 0.20\%$, and $1\pm 0.04\%$, respectively. Induction of brain ischemia decreased the value of glutathione level and catalase and SOD activities in control ischemic rats and their values were obtained to be $0.55\pm 0.09\%$, $0.44\pm 0.05\%$, and $0.86\pm 0.02\%$, respectively. Fullerene significantly increased the activities of catalase ($0.93\pm 0.29\%$) and SOD ($1.33\pm 0.22\%$) in ischemic treatment group compared to ischemic control rats, but did not change the glutathione level ($0.52\pm 0.25\%$).

Conclusion: The results of this study showed that treatment with fullerene nanoparticles improves the brain antioxidant defense system, which is weakened during brain ischemia, through increasing catalase and SOD activities.

Keywords: Brain ischemia; Hydroxylated fullerene; Antioxidants; Immune system.

تأثیر نانوذره فولرن هیدروکسیله بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در موش صحرایی دچار ایسکمی مغز

شمسی دارابی^۱، محمدتقی محمدی^{۱*}

چکیده

زمینه و هدف: براساس یافته‌های پیشین، ایسکمی مغز، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی را تضعیف می‌کند. این مطالعه با هدف بررسی تأثیر نانوذره فولرن هیدروکسیله بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در موش صحرایی دچار ایسکمی مغز انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، موش‌های صحرایی به سه گروه (هرگروه ۶ موش): گروه شاهد، کنترل ایسکمی و ایسکمی درمان تقسیم شدند. ایسکمی مغز با انسداد شریان میانی مغز (MCA) برای ۹۰ دقیقه و در پی آن ۲۴ ساعت خون‌رسانی مجدد ایجاد شد. حیوانات گروه ایسکمی، درمان فولرن را (دوز ۱۰ میلی‌گرم به‌ازای یک کیلوگرم) به‌طور داخل - صفاقی بلافاصله در خاتمه انسداد MCA دریافت کردند. بعد از ۲۴ ساعت دوره خون‌رسانی مجدد، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، SOD و گلوکوتایون مغز با روش‌های بیوشیمیایی بررسی گردید. داده‌ها با استفاده از روش آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی تحلیل شدند.

یافته‌ها: میانگین میزان گلوکوتایون فعالیت‌های کاتالاز و SOD در حیوانات شاهد به ترتیب 1.1 ± 0.18 ، 1.1 ± 0.20 و 1.1 ± 0.04 بود. القای ایسکمی مغز؛ نتایج عددی میزان گلوکوتایون، فعالیت‌های کاتالاز و SOD در حیوانات کنترل ایسکمی را کاهش داد و مقدار عددی آنها به ترتیب برابر 0.55 ± 0.09 ، 0.44 ± 0.10 و 0.86 ± 0.02 درصد به دست آمد. فولرن به‌طور معنی‌داری فعالیت‌های کاتالاز (0.93 ± 0.29) و SOD (1.33 ± 0.22) را در گروه ایسکمی درمان در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی افزایش داد، اما سطح گلوکوتایون (0.52 ± 0.25) را تغییر نداد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد درمان با نانوذرات فولرن، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی مغز را که در طی ایسکمی مغز ضعیف می‌شود از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و SOD بهبود می‌بخشد.

کلیدواژه‌ها: ایسکمی مغز؛ فولرن هیدروکسیله؛ آنتی‌اکسیدان‌ها؛ سیستم ایمنی.

گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

محمدتقی محمدی، گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
mohammadimohammad@bmsu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۲۷

تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۲۵

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Darabi Sh, Taghi Mohammadi M. The effect of hydroxylated fullerene nanoparticles on antioxidant defense system in brain ischemia rat. Qom Univ Med Sci J 2017;11(3):1-10. [Full Text in Persian]

مقدمه

سالانه، افراد زیادی به دلایل مختلف، به درجاتی از سکنه مغزی و عوارض آن مبتلا می‌شوند (۱). سکنه ایسکمی، نوع رایجی از سکنه مغزی بوده که همراه با کاهش شدید و یا قطع موقتی جریان خون در یک ناحیه از مغز است (۲)، و موجب کاهش اکسیژن و مواد متابولیکی مورد نیاز بافت مغز، همچنین عدم برداشت مواد زائد سلول‌ها می‌شود (۳). به‌منظور کاهش آسیب ناشی از ایسکمی مغز، درک کافی از مکانیسم‌های آن ضروری به‌نظر می‌رسد. شناخته‌شده‌ترین مکانیسم ایسکمی - خون‌رسانی مجدد مغز، تولید رادیکال‌های آزاد می‌باشد. در شرایط طبیعی، رادیکال‌ها و اکسیدان‌های تولیدی به‌وسیله سیستم آنتی‌اکسیدانی خنثی می‌شوند (۴،۵). سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، از آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی (گلوکاتینون) و آنزیمی (سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز) تشکیل شده است. گلوکاتینون از واکنش گروه‌های عامل‌دار اکسیژن (مانند رادیکال‌های آزاد و پراکسیدها) با ماکرومولکول‌ها جلوگیری می‌کند (۶،۷). آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز باعث تبدیل آنیون سوپراکسید به پراکسید هیدروژن می‌شود (۸). همچنین آنزیم کاتالاز باعث تبدیل پراکسید هیدروژن به اکسیژن و آب می‌گردد (۹،۱۰). در شرایط ایسکمی مغزی نیز سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، به میزان زیادی تضعیف می‌شود (۱۱). بر این اساس، حذف رادیکال‌ها در حین ایسکمی، همچنین تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بافت مغز می‌تواند بسیاری از آسیب‌های سکنه مغزی را کاهش دهد.

برپایه نتایج برخی مطالعات، بعضی از نانوذرات کربن دارای خاصیت قوی آنتی‌اکسیدانی هستند که در جلوگیری از آسیب‌های رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌توانند مفید باشند (۱۲،۱۳). فولرن (C_{60}) که سومین آلوتروپ اتم کربن است، یکی از این نانوذرات‌ها می‌باشد (۱۴). یافته‌های اخیر نشان می‌دهند فولرن قادر است به‌عنوان یک "جاذب رادیکال آزاد" عمل کند (۱۵). در مطالعه‌ای که Chiang و همکاران انجام دادند فولرن هیدروکسیله شده توانست آنیون‌های سوپراکسید ناشی از گزانتین را که به‌وسیله آنزیم گزانتین - اکسیداز تولید شده، از محیط سلول جمع‌آوری کند (۱۶). طبق نتایج مطالعات، عامل‌دار کردن این ماده، به‌خصوص با گروه‌های هیدروکسیل، ماهیت روبشی

رادیکال‌های آزاد این ترکیب را افزایش می‌دهد (۱۷). در تحقیق دیگری مشخص گردید فولرن هیدروکسیله شده علاوه بر حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS)، باعث حذف رادیکال‌های آزاد نیتروژن (RNS) از محیط کشت سلول‌ها می‌شود (۱۸،۱۹). با توجه به این نتایج، هنوز اطلاعاتی درخصوص تأثیر این نانوذره بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی مغز در شرایط ایسکمی در دست نیست. لذا در این مطالعه سعی گردید تا تأثیر نانوذره فولرن هیدروکسیله بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی مغز پس از ایسکمی در مدل انسداد شریانی میانی مغز در موش صحرایی بررسی گردد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، از ۱۸ سر موش صحرایی بالغ نر نژاد ویستار (با محدوده وزنی ۲۷۰-۳۲۰ گرم)، خریداری شده از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، استفاده گردید. حیوانات قبل از مطالعه و در طی آزمایش در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، رطوبت مناسب، درجه حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد) با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. تمام آزمایشها طبق مقررات اخلاقی کار با حیوانات، مصوب شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) انجام گرفت.

برای آماده‌سازی حیوان جهت ایجاد ایسکمی موقتی - موضعی مغز، از روش ارائه شده توسط Longa و همکاران استفاده گردید (۲۰). در ابتدا موش‌های صحرایی با ایزوفلوران ۲/۵٪ (انگلستان) بیهوش شدند. در ادامه، بعد از تثبیت حیوان بر روی میز جراحی، ناحیه گردن را از وسط باز کرده و بافت همبند و عضلات کنار زده شد تا امکان دسترسی آسان به شریان کاروتید مشترک و شاخه‌های آن (خارجی و داخلی) فراهم گردد. در گروه‌های ایسکمی، با بستن موقت شریان کاروتید مشترک طرف راست، شکاف ظریفی در شاخه کاروتید خارجی ایجاد گردید و همزمان با بستن قسمت پایین آن، نخ نایلون آماده شده (شماره ۳-۰) که نوک آن به‌وسیله حرارت گرد شده و سطح آن با پلی‌ال-لینزین پوشانده شده بود، از راه شکاف وارد شریان داخلی و از آنجا به آرامی به داخل مجامه و سپس به طرف حلقه ویلیس هدایت گردید تا به ابتدای شریان میانی مغز برسد.

نرمال‌سالیین حل گردید. در نهایت، محلول فولرن تهیه‌شده به‌صورت تازه و پس از محاسبه مقدار تزریق (۱۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم) برای هر حیوان به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. میزان حجم تزریق بین ۱-۰/۵ میلی‌لیتر (متناسب با وزن حیوان و محاسبات) بود که معادل آن نرمال‌سالیین به حیوانات گروه شاهد و کنترل ایسکمی تزریق گردید. ۲۴ ساعت بعد از جراحی در حیوانات گروه شاهد و ۲۴ ساعت بعد از خاتمه انسداد شریان میانی مغز در حیوانات گروه ایسکمی (کنترل ایسکمی و ایسکمی درمان‌شده با فولرن)، حیوانات تحت بیهوشی عمیق قرار گرفتند و مغز پس از خارج شدن به سرعت به داخل نیتروژن مایع و فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد انتقال یافت. در روز آزمایش، بافت‌های منجمدشده به‌دقت توزین و به نسبت ۱:۱۰ در بافر فسفات سالیین هم‌وزنه شدند. سپس نمونه‌ها در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. از محلول رویی جهت سنجش شاخص‌های سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی مغز موردنظر (مقدار گلوتاتیون، فعالیت آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز) استفاده شد.

برای سنجش میزان گلوتاتیون بافت، از روش Tietz استفاده گردید (۲۳). غلظت مناسبی از نمونه هم‌وزنه با ۱۰ میکرولیتر اسیدسولفوسالسیلیک ۵٪، مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. در ادامه، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته شد و به ۸۱۰ میکرولیتر دی‌سدیم فسفات ۰/۳ مولار اضافه گردید. سپس با اضافه کردن ۹۰ میکرولیتر معرف دی‌تیو- بیس- نیتروبنزوتیک اسید (DTNB) ۰/۰۴٪ محلول در سیترات سدیم ۰/۱٪، واکنش شروع شد. تغییرات جذب در طول موج ۴۱۲ نانومتر در طی ۵ دقیقه قرائت گردید. با استفاده از محلول گلوتاتیون ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، منحنی استاندارد گلوتاتیون رسم شد و غلظت گلوتاتیون برحسب میکرومولار بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. محلول استاندارد گلوتاتیون در غلظت‌های ۲۵-۲۰۰ میکرومولار تهیه شد. در نهایت، میزان گلوتاتیون مغز به‌صورت درصد به گروه شاهد، محاسبه و ارائه گردید.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز، از روش Abei استفاده شد (۲۴).

با عبور نوک نخ از ابتدای شریان میانی مغز، مقاومت اندکی در هدایت آن ایجاد شد (۲۱). بعد از اطمینان از قرارگیری نخ آماده‌شده در محل مورد نظر، نخ نایلون به مدت ۹۰ دقیقه در محل تثبیت شد. برای خاتمه ایسکمی و خون‌رسانی مجدد، نخ نایلون به آرامی از رگ بیرون آورده شد و با بستن شریان خارجی، زخم‌های ایجادشده در ناحیه گردن بخیه زده شدند و حیوان تا به‌هوش آمدن در محل گرم نگهداری شد. در تمام دوره آزمایش تا خاتمه بیهوشی، درجه حرارت حیوان با کمک لامپ گرم‌کننده (در محدوده ۳۷-۳۸ درجه سانتیگراد) ثابت نگه داشته شد. بعد از هوشیاری کامل، حیوان به قفس منتقل گردید و تا انجام آزمایش‌های بعدی در شرایط مناسب نگهداری شد.

حیوانات مورد نظر به‌صورت تصادفی در سه گروه به شرح زیر قرار گرفتند:

۱- گروه شاهد (n=۶): در حیوانات این گروه بعد از بیهوشی، عمل جراحی جهت انسداد شریان میانی مغز با آشکارسازی شریان کاروتید مشترک، شریان‌های کاروتید خارجی و داخلی در ناحیه گردن انجام شد، ولی عمل انسداد شریان میانی مغز صورت نگرفت. ۲- گروه ایسکمی - خون‌رسانی مجدد (n=۶): در حیوانات این گروه تمام اعمال جراحی تا مرحله القای ایسکمی مشابه گروه شاهد بود. القای ایسکمی به مدت ۹۰ دقیقه ادامه یافت و مرحله خون‌رسانی مجدد (۲۴ ساعت) با بیرون کشیدن آهسته نخ، شروع و بعد از ۱۵ دقیقه، محل جراحی بخیه زده شد و حیوان در محل مناسب نگهداری شد.

۳- گروه ایسکمی - خون‌رسانی مجدد و درمان با فولرن (n=۶): حیوانات این گروه در پایان انسداد شریان میانی مغز و بلافاصله با شروع مرحله خون‌رسانی مجدد، فولرن (۱۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم) (۲۲)، را به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند و در این گروه مابقی پروتکل‌ها و جراحی جهت فیلامان‌گذاری برای القای ایسکمی - خون‌رسانی مجدد همانند گروه کنترل ایسکمی - خون‌رسانی مجدد انجام گرفت.

در این تحقیق، ماده مورد استفاده برای تیمار حیوانات (فولرن هیدروکسیله) از شرکت سیگما (آمریکا) خریداری شد. جهت آماده‌سازی فولرن برای تزریق، ابتدا پودر خریداری‌شده به‌وسیله ترازوی دقیق دیجیتالی وزن شد و به‌صورت تازه با محلول

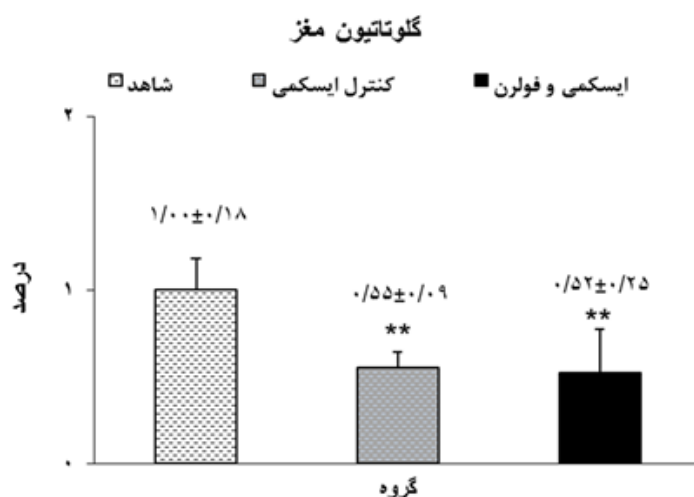
یک واحد فعالیت SOD، معادل مقدار آنزیم مورد نیاز است تا ۵۰٪ از سرعت احیای NBT مهار گردد. فعالیت آنزیم برحسب واحد بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. در نهایت، میزان فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز مغز به صورت درصد به گروه شاهد محاسبه و ارائه شد.

نتایج به دست آمده به صورت میانگین \pm انحراف معیار (mean \pm SD) ارائه شده‌اند. برای مقایسه داده‌ها بین گروه‌های مختلف از روش آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و از تست تعقیبی توکی استفاده گردید. در تمامی مقایسه‌ها، $p < 0.05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در گروه شاهد جراحی، میزان گلوکوتاتیون مغز، 1.00 ± 0.18 ٪ بود. مقادیر عددی این پارامتر برای گروه کنترل ایسکمی، 0.55 ± 0.09 ٪ به دست آمد. استفاده از نانوذره فولرن در گروه ایسکمی درمان‌شده، میزان گلوکوتاتیون را به 0.52 ± 0.25 ٪ تغییر داد. اختلاف میانگین گلوکوتاتیون مغز در گروه شاهد و کنترل ایسکمی ($p < 0.01$) و گروه شاهد و ایسکمی همراه فولرن ($p < 0.01$)، معنی‌دار بود. این اختلاف در گروه کنترل ایسکمی با گروه ایسکمی همراه فولرن، معنی‌دار نبود (نمودار شماره ۱).

به حجم معینی از عصاره بافتی، اتانول مطلق (۱/۰ میلی‌لیتر به ازای میلی‌لیتر) اضافه شد و مدت ۳۰ دقیقه در یخ انکوبه گردید. سپس تریتون (X-100/۱۰) با غلظت نهایی ۱٪ اضافه شد. این محلول جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم به کار برده شد. واکنش با اضافه کردن ۳۰ میلی‌لیتر H_2O_2 ، ۰/۵ میلی‌مولار به نمونه بافتی در بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) شروع گردید. سپس جذب در طی ۳ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر قرائت شد. (یک واحد فعالیت کاتالاز معادل مقدار یک میکرومول از H_2O_2 بوده که در یک دقیقه تجزیه می‌شود). فعالیت آنزیم برحسب واحد بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. در نهایت، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز مغز، به صورت درصد به گروه شاهد، محاسبه و ارائه شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز (SOD)، از روش Winterbourn استفاده گردید (۲۵). ۰/۲ میلی‌لیتر EDTA ۰/۱ مولار در سدیم سیانید ۰/۳ میلی‌مولار، ۰/۱ میلی‌لیتر نیتروبلوتترازولیوم (NBT) ۱/۵ میلی‌مولار و ۲۰۰ میکرولیتر بافت هموزنه (با بافر برای کنترل) به یک کووت، اضافه و بعد از مخلوط شدن به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس ۰/۰۵ میلی‌لیتر ریبوفلاوین ۰/۱۲ میلی‌مولار به بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۶۷ مولار (pH=۷/۸)، اضافه و به مدت ۱۲ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار داده شد. سپس جذب در طی ۵ دقیقه در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت گردید.

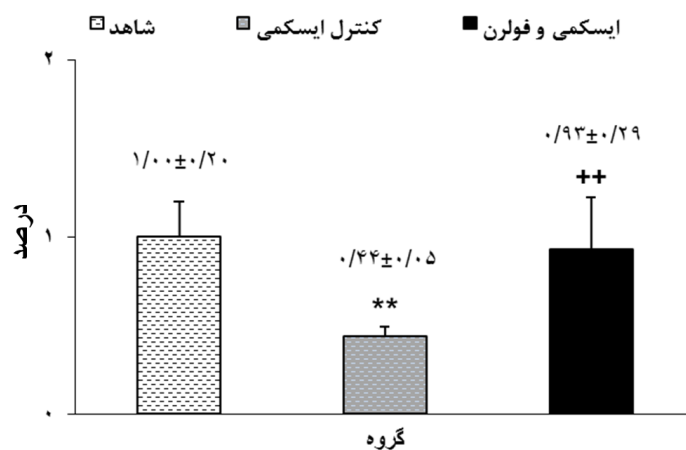


نمودار شماره ۱: میزان درصد گلوکوتاتیون مغز در پایان آزمایش در گروه‌های شاهد، کنترل ایسکمی و ایسکمی درمان‌شده با فولرن. داده‌ها به صورت $means \pm SD$ نشان داده شده است. ** نشانگر تفاوت معنی‌دار با $p < 0.01$ نسبت به گروه شاهد.

افزایش داد (0.93 ± 0.29). اختلاف میانگین کاتالاز مغز در گروه شاهد، کنترل ایسکمی ($p < 0.01$) و گروه شاهد و ایسکمی همراه فولرن ($p < 0.01$)، معنی‌دار بود. این اختلاف در گروه کنترل ایسکمی با گروه ایسکمی همراه فولرن ($p < 0.01$) نیز معنی‌دار بود (نمودار شماره ۲).

در گروه شاهد جراحی، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز مغز در نیمکره راست، 1.0 ± 0.20 بود. مقادیر عددی این پارامتر برای گروه کنترل ایسکمی، 0.44 ± 0.05 به دست آمد. استفاده از نانوذره فولرن در گروه ایسکمی درمان‌شده، بلافاصله در ابتدای خون‌رسانی مجدد، میزان درصد فعالیت آنزیم کاتالاز را

فعالیت کاتالاز مغز

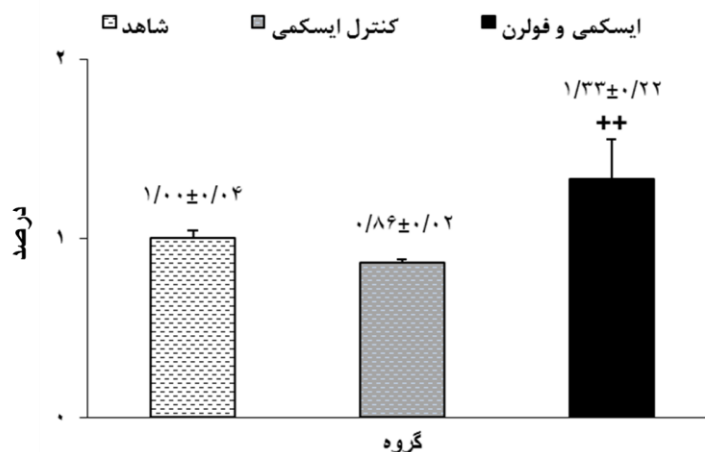


نمودار شماره ۲: میزان درصد فعالیت آنزیم کاتالاز مغز در پایان آزمایش در گروه‌های شاهد، کنترل ایسکمی و ایسکمی درمان‌شده با فولرن. داده‌ها به صورت $\text{means} \pm \text{SD}$ نشان داده شده است. ** نشانگر تفاوت معنی‌دار با $p < 0.01$ نسبت به گروه شاهد. ++ نشانگر تفاوت معنی‌دار با $p < 0.01$ نسبت به گروه کنترل ایسکمی.

اختلاف میانگین سوپراکساید دیسموتاز مغز در گروه شاهد و کنترل ایسکمی، معنی‌دار نبود و گروه شاهد و ایسکمی همراه فولرن ($p < 0.01$)، معنی‌دار بود. این اختلاف در گروه کنترل ایسکمی با گروه ایسکمی همراه فولرن ($p < 0.01$)، معنی‌دار بود (نمودار شماره ۳).

در گروه شاهد جراحی، میزان فعالیت این آنزیم 1.0 ± 0.04 بود. مقادیر درصدی این پارامتر برای گروه کنترل ایسکمی، 0.86 ± 0.02 به دست آمد که نسبت به گروه شاهد کاهش نشان داد. استفاده از نانوذره فولرن در گروه ایسکمی درمان‌شده، بلافاصله در ابتدای خون‌رسانی مجدد، میزان فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز را افزایش داد (1.33 ± 0.22).

فعالیت سوپراکساید دیسموتاز مغز



نمودار شماره ۳: میزان درصد فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز مغز در پایان آزمایش در گروه‌های شاهد، کنترل ایسکمی و ایسکمی درمان‌شده با فولرن. داده‌ها به صورت $\text{means} \pm \text{SD}$ نشان داده شده است. ++ نشانگر تفاوت معنی‌دار با $p < 0.01$ نسبت به گروه کنترل ایسکمی.

بحث

عدم تغییر در میزان گلوکوتاتیون مغز ایسکمی شده و یا اینکه فولرن بر میزان تغییرات گلوکوتاتیون مغز که در حین ایسکمی مغز ایجاد می‌شود بی‌تأثیر است، تنها در یک مطالعه که توسط Vani و همکاران انجام گرفت استفاده از این نانوذره توانست میزان گلوکوتاتیون مغز را افزایش دهد (۳۸).

مطالعات اخیر نشان می‌دهند بعد از ایسکمی مغز، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی مغز تضعیف شده و حذف آنزیمی رادیکال‌های آزاد، به‌خصوص در زمان خون‌رسانی مجدد که مقادیر زیادی اکسیژن به نیمکره ایسکمی رسانده می‌شود، دچار نقص می‌گردد (۴۰، ۳۹). از مهم‌ترین این آنزیم‌ها می‌توان به آنزیم‌های سوپراکساید دیسموتاز و کاتالاز اشاره کرد (۴۲-۴۰). نتایج تحقیق حاضر نشان داد میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه کنترل ایسکمی نسبت به گروه شاهد به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای کاهش یافته است. کاتالاز از آنزیم‌های مهم سیستم دفاعی بدن در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن است که با تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن، از اثرات مخرب آن می‌کاهد. براساس نتایج برخی تحقیقات، کاتالاز با حذف پراکسید هیدروژن، از اثرات مخرب آن جلوگیری می‌کند (۴۳). از آنجایی که پراکسید هیدروژن به‌راحتی می‌تواند از غشاهای سلولی عبور کرده و اثرات تخریبی خود را اعمال کند، اهمیت آنزیم کاتالاز در حذف پراکسید هیدروژن به‌خوبی مشخص می‌شود (۴۳). لذا در مطالعه حاضر، کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز، موجب تضعیف سیستم آنتی‌اکسیدانی مغز مبتلا به ایسکمی شده که زمینه را برای تخریب بافت مغز و افزایش ضایعات فراهم می‌کند. ضمن اینکه در تحقیق حاضر استفاده از فولرن بعد از القای ایسکمی مغز موجب افزایش قابل‌توجه در فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به گروه شاهد و کنترل ایسکمی گردید. این نتیجه حاکی از این است که این نانوذره توانسته سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی مغز ایسکمی شده را از طریق افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز تقویت کند. چنانکه برخی تحقیقات با افزایش بیان آنزیم کاتالاز از طریق تراریخته نشان دادند ضایعه ناشی از ایسکمی مغز که قسمتی به دلیل عملکرد رادیکال‌های آزاد است در نتیجه افزایش تولید کاتالاز، کاهش می‌یابد (۴۴). در مطالعه حاضر، میزان فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز پس از القای ایسکمی مغزی در گروه کنترل ایسکمی نسبت به

براساس تحقیقات اخیر، برخی از نانوذرات‌های کربن دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و روبشی برای رادیکال‌های آزاد در محیط‌های بیولوژیکی هستند که از بین این نانوذرات‌ها، نانوذره فولرن توجه برخی محققین را به خود جلب کرده است (۲۶، ۲۷). بر این اساس، در تحقیق حاضر تأثیر این نانوذره بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی مغز در سکنه ایسکمی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین القای ایسکمی مغز باعث گردید تا میزان گلوکوتاتیون فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکساید دیسموتاز مغز کاهش یابد. در طرف مقابل، استفاده از نانوذره فولرن بعد از اتمام ایسکمی و بلافاصله با شروع خون‌رسانی مغز، میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز مغز ایسکمی شده را به مقدار زیاد و معنی‌داری در مقایسه با حیوانات ایسکمی درمان‌نشده افزایش داد. طبق این نتایج، فولرن باعث بهبود سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی مغز ایسکمی شده می‌شود.

در تحقیق حاضر، میزان گلوکوتاتیون مغز در گروه کنترل ایسکمی نسبت به گروه شاهد کاهش یافت. طبق نتایج مطالعات انجام‌شده، گلوکوتاتیون تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در مغز را پس از آسیب ایسکمی کاهش می‌دهد (۲۸، ۲۹). همچنین در شرایط استرس ایسکمی، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در مغز موجب فعال‌شدن سیگنال‌های مخرب نورونی گسترده شده که منجر به ضایعات وسیعی در مغز می‌گردد (۳۰). برخی از مطالعات بالینی نشان می‌دهند افزایش خطر سکنه مغزی با سطوح پایین گلوکوتاتیون در مغز ارتباط دارد و در پی افزایش فاکتورهای استرس اکسیداتیو در بافت مغز ایسکمی، مقدار گلوکوتاتیون نیز کاهش می‌یابد (۳۴-۳۱). گلوکوتاتیون با احیای رادیکال‌های آزاد توسط عامل تیولی موجب خنثی‌شدن و از بین رفتن رادیکال‌های آزاد و اثرات مخرب آنها شده و در برابر اختلال عملکرد اندوتلیال عروق مغزی و مرگ سلولی، اثرات محافظتی دارد (۳۷-۳۵) (۳۳). نتایج به‌دست‌آمده در تحقیق حاضر نشان داد فولرن در گروه ایسکمی درمان‌شده نسبت به گروه کنترل ایسکمی، تغییری ایجاد نکرده و نمی‌تواند بر میزان گلوکوتاتیون تأثیری داشته باشد (هرچند نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد). به‌نظر می‌رسد روش به‌کارگیری این نانوذره، با استفاده از دوز دارویی متفاوت سبب

همسو با یافته این تحقیق، نتایج مطالعه‌ای دیگری نشان داد با روش تراریخته، میزان بیان سوپراکساید دیسموتاز افزایش یافته و عوارض ناشی از رادیکال‌های آزاد و ایسکمی به مقدار زیادی کاهش می‌یابد (۴۶،۳۸).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این تحقیق، می‌توان گفت استفاده از نانوذرات فولرن هیدروکسیله شده بعد از ایسکمی مغز باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکساید دیسموتاز شده، همچنین سبب بهبود قدرت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی مغز ایسکمی می‌گردد که بعد از بروز ایسکمی مغز به شدت تضعیف می‌شود. بر این اساس، با استفاده از این نانوذره می‌توان با تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و کاهش تجمع رادیکال‌های آزاد در مغز ایسکمی شده، از تشدید آسیب به مغز جلوگیری کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله قسمتی از نتایج پایان‌نامه دکتری می‌باشد. بدین وسیله از گروه فیزیولوژی، بیوفیزیک دانشکده پزشکی و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله جهت فراهم کردن مقدمات انجام پروژه حاضر، تشکر و قدردانی می‌شود.

گروه شاهد کاهش یافت. هرچند این کاهش به لحاظ آماری معنی‌دار نبود، اما کاهش این آنزیم در حین ایسکمی در بافت مغز مورد تأیید سایر محققین نیز قرار گرفته است (۳۸). گزارش شده رادیکال‌های آزاد مثل آنیون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن می‌توانند موجب تضعیف فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز شده، همچنین باعث کاهش میزان گلوتاتیون شوند (۵). آنزیم سوپراکساید دیسموتاز، یکی از آنزیم‌های مهم سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی مغز بوده و در حذف رادیکال‌های آزاد، نقش اساسی دارد و در شرایطی که آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی از جمله سوپراکساید دیسموتاز فعال است آبشار اکسیدان‌های مخرب سلولی را مهار کرده و سلول‌ها را در برابر آسیب رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کند (۴۵). در مروری که Slemmer (سال ۲۰۰۸) ارائه داد نیز این یافته تأیید شده است (۵). براساس یافته‌های مطالعه حاضر، استفاده از فولرن بعد از خاتمه ایسکمی و شروع خون‌رسانی مجدد موجب افزایش قابل توجهی در فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز نسبت به گروه شاهد و کنترل ایسکمی، شده است. این نتیجه حاکی از این است که این نانوذره توانسته سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی مغز ایسکمی شده را از طریق افزایش فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز تقویت کند.

References:

1. Taylor TN, Davis PH, Torner JC, Holmes J, Meyer JW, Jacobson MF. Lifetime cost of stroke in the United States. *Stroke* 1996;27(9):1459-66.
2. White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, et al. Brain ischemia and reperfusion: Molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci* 2000;179(S1-2):1-33.
3. Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatr Nephrol* 2007;22(6):778-84.
4. Rodrigo R, Fernandez-Gajardo R, Gutierrez R, Matamala JM, Carrasco R, Miranda-Merchak A, et al. Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: Novel therapeutic opportunities. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2013;12(5):698-714.
5. Slemmer JE, Shacka JJ, Sweeney MI, Weber JT. Antioxidants and free radical scavengers for the treatment of stroke, traumatic brain injury and aging. *Curr Med Chem* 2008;15(4):404-14.
6. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione ,a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol* 2003;66(8):1499-503.

7. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003;333(1):19-39.
8. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995;64:97-112.
9. Sendur OF, Turan Y, Tastaban E, Serter M. Antioxidant status in patients with osteoporosis: A controlled study. *Joint Bone Spine* 2009;76(5):514-8.
10. Hall NJ, Ali J, Pierro A, Eaton S. Total glutathione is not decreased in infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2005;40(5):769-73.
11. Fukui S, Ookawara T, Nawashiro H, Suzuki K, Shima K. Post-ischemic transcriptional and translational responses of EC-SOD in mouse brain and serum. *Free Radic Biol Med* 2002;32(3):289-98.
12. Liao F, Saitoh Y, Miwa N. Anticancer effects of fullerene [C60] included in polyethylene glycol combined with visible light irradiation through ROS generation and DNA fragmentation on fibrosarcoma cells with scarce cytotoxicity to normal fibroblasts. *Oncol Res* 2011;19(5):203-16.
13. Lens M, Medenica L, Citernes U. Antioxidative capacity of C(60) (buckminsterfullerene) and newly synthesized fulleropyrrolidine derivatives encapsulated in liposomes. *Biotechnol Appl Biochem* 2008;51(Pt 3):135-40.
14. Yin JJ, Lao F, Fu PP, Wamer WG, Zhao Y, Wang PC, et al. The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials. *Biomaterials* 2009;30(4):611-21.
15. Chistyakov VA, Smirnova YO, Prazdnova EV, Soldatov AV. Possible mechanisms of fullerene C(6)(0) antioxidant action. *BioMed Res Int* 2013;2013:821498.
16. Chiang LY, Lu FJ, Lin JT. Free radical scavenging activity of water-soluble fullerenols. *World J Surg* 2000;24(4):450-4.
17. Cai X, Jia H, Liu Z, Hou B, Luo C, Feng Z, et al. Polyhydroxylated fullerene derivative C(60)(OH)(24) prevents mitochondrial dysfunction and oxidative damage in an MPP(+)-induced cellular model of Parkinson's disease. *J Neurosci Res* 2008;86(16):3622-34.
18. Mirkov SM, Djordjevic AN, Andric NL, Andric SA, Kostic TS, Bogdanovic GM, et al. Nitric oxide-scavenging activity of polyhydroxylated fullereneol, C60(OH)24. *Nitric oxide* 2004;11(2):201-7.
19. Fluri F, Grunstein D, Cam E, Ungethuem U, Hatz F, Schafer J, et al. Fullerenols and glucosamine fullerenes reduce infarct volume and cerebral inflammation after ischemic stroke in normotensive and hypertensive rats. *Exp Neurol* 2015;265:142-51.
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. [Full Text in Persian]
22. Monteiro-Riviere NA, Linder KE, Inman AO, Saathoff JG, Xia XR, Riviere JE. Lack of hydroxylated fullerene toxicity after intravenous administration to female Sprague-Dawley rats. *J Toxicol Environ Health A* 2012;75(7):367-73.
23. Tietz F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amount of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 1969;27(3):502-22.
24. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-6.
25. Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrell RW. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 1975;85(2):337-41.
26. Grebowski J, Kazmierska P, Krokosz A. Fullerenols as a new therapeutic approach in nanomedicine. *Bio Med Res Int* 2013;2013:751913.

27. Kim YO, Kim HJ, Kim SK, Yoon B. Neuroprotective effects of hydroxyfullerene in rats subjected to global cerebral ischemia. *Mol Cell Toxicol* 2008;4(3):218-23.
28. Hyun SW, Jung YS. Hypoxia induces FoxO3a-mediated dysfunction of blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;450(4):1638-42.
29. Jacobs KM, Pennington JD, Bisht KS, Aykin-Burns N, Kim H-S, Mishra M, et al. SIRT3 interacts with the daf-16 homolog FOXO3a in the mitochondria, as well as increases FOXO3a dependent gene expression. *Int J Biol Sci* 2008;4(5):291-9.
30. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: An integrated view. *Trends Neurosci* 1999;22(9):391-7.
31. Namba K, Takeda Y, Sunami K, Hirakawa M. Temporal profiles of the levels of endogenous antioxidants after four-vessel occlusion in rats. *J Neurosurg Anesthesiol* 2001;13(2):131-7.
32. Park EM, Choi JH, Park JS, Han MY, Park YM. Measurement of glutathione oxidation and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine accumulation in the gerbil hippocampus following global ischemia. *Brain Res Protoc* 2000;6(1):25-32.
33. Okouchi M, Okayama N, Aw TY. Preservation of cellular glutathione status and mitochondrial membrane potential by N-acetylcysteine and insulin sensitizers prevent carbonyl stress-induced human brain endothelial cell apoptosis. *Curr Neurovasc Res* 2009 Nov;6(4):267-78.
34. Takahashi K, Tatsunami R, Oba T, Tampo Y. Buthionine sulfoximine promotes methylglyoxal-induced apoptotic cell death and oxidative stress in endothelial cells. *Biol Pharm Bull* 2010;33(4):556-60.
35. Ahmed Z, Tang WW. Pharmacologic strategies to target oxidative stress in heart failure. *Curr Heart Fail Rep* 2012;9(1):14-22.
36. Biswas SK, Newby DE, Rahman I, Megson IL. Depressed glutathione synthesis precedes oxidative stress and atherogenesis in Apo-E^{-/-} mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338(3):1368-73.
37. Usatyuk PV, Vepa S, Watkins T, He D, Parinandi NL, Natarajan V. Redox regulation of reactive oxygen species-induced p38 MAP kinase activation and barrier dysfunction in lung microvascular endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* 2003;5(6):723-30.
38. Vani JR, Mohammadi MT, Foroshani MS, Jafari M. Polyhydroxylated fullerene nanoparticles attenuate brain infarction and oxidative stress in rat model of ischemic stroke. *EXCLI J* 2016;15:378-90.
39. 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.
40. Deng XL, Qian ZY, Liu NF, Ma XY, Wang HF, Hou ZJ. Antagonistic effect of 3,6-dimethamidodibenzopyridonium gluconate on lipid peroxidation in cerebral cortical neuronal cultures and rat brains during focal cerebral ischemia reperfusion. *Acta Pharmacol Sin* 2000;21(5):460-2.
41. Yoshida T, Watanabe M, Engelman DT, Engelman RM, Schley JA, Maulik N, et al. Transgenic mice overexpressing glutathione peroxidase are resistant to myocardial ischemia reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28(8):1759-6.
42. Sinha K, Degaonkar MN, Jagannathan NR, Gupta YK. Effect of melatonin on ischemia reperfusion injury induced by middle cerebral artery occlusion in rats. *Eur J Pharmacol* 2001;428(2):185-92.
43. Singhal A, Morris V, Labhasetwar V, Ghorpade A. Nanoparticle-mediated catalase delivery protects human neurons from oxidative stress. *Cell Death Dis* 2013;4:e903.
44. Armogida M, Spalloni A, Amantea D, Nutini M, Petrelli F, Longone P, et al. The protective role of catalase against cerebral ischemia in vitro and in vivo. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2011;24(3):735-47.
45. Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 2010;48(12):909-30.
46. Kinouchi H, Epstein CJ, Mizui T, Carlson E, Chen SF, Chan PH. Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing CuZn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(24):11158-62.