

تأثیر سرمادرمانی بر میزان التهاب و حجم ضایعه متعاقب هیپوکسی در موش بزرگ صحرائی نر

مهرداد نصرالله زاده^۱، لعیا قهاری^۲، منوچهر صفری^۳

۱- گروه فناوری های نوین، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران ۲- گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران. نویسنده مسئول. ۳- گروه فناوری های نوین، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
<p>نوع مقاله پژوهشی</p> <p>تاریخچه مقاله دریافت: ۱۳۹۶/۹/۱۲ پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۱۲</p> <p>کلید واژگان هیپوکسی- ایسکمی، مغز، سرمادرمانی، موش بزرگ صحرائی.</p> <p>نویسنده مسئول Email: l-ghahari@razi.tums.ac.ir</p>	<p>مقدمه: کمبود اکسیژن متعاقب ایسکمی منجر به تغییرات زیان آوری در ساختار و عملکرد مغز میشود. کاهش یا قطع جریان خون به قسمتی از مغز منجر به ایجاد ایسکمی مغزی موضعی می شود. کاهش التهاب، مهار آپوپتوزیس، ترمیم آکسونهای آسیب دیده و آنژیوژنز عواملی هستند که می توانند به ترمیم بافت عصبی در نواحی آسیب دیده کمک کنند و عوارض ناشی از آن را کاهش دهند. سرمادرمانی با کاهش ادم و عوارض ناشی از ریپرفیوژن، صدمه سلولی را کاهش میدهد.</p> <p>روش کار: در این تحقیق از ۱۶ راس موش صحرائی نژاد ویستار نر با وزن ۲۵۰ گرم در دو گروه هیپوکسی و گروه سرمادرمانی استفاده شد. برای بیهوشی از کلرال هیدرات با دوز ۴۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن استفاده شد که به صورت داخل صفاقی تزریق شد. سپس شریان کاروتید داخلی سمت چپ بصورت موقت و بمدت یک ساعت قطع گشته و اکسیژن رسانی مختل شد. با برقراری مجدد جریان خون، از کیسه یخ بصورت موضعی بر روی گردن موش صحرائی بمدت نیم ساعت استفاده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت رت ها ذبح شده و نمونه ها با کرزیل ویوله رنگ آمیزی شد. سپس با دوربین دیجیتال Canon و زوم اپتیکال ۱۰ عکس برداری صورت گرفت. ادم مغزی، حجم ضایعه و مرگ سلولی محاسبه شد و توسط نرم افزار Spss مورد تحلیل قرار گرفت.</p> <p>یافته ها: سلولهای مرده در گروه درمانی کاهش داشته و سلولهای نرمال بیشتر دیده میشود. استفاده از سرمادرمانی موضعی ادم مغزی را کاهش داده است. حجم ضایعه در گروه درمانی نسبت به گروه هیپوکسی بصورت معنی داری کاهش داشته است.</p> <p>بحث و نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داده است که استفاده از سرمادرمانی موضعی حجم ضایعه و آسیب مغزی متعاقب آن را بواسطه کاهش عوارض ریپرفیوژن کاهش میدهد. با استفاده از نتایج بدست آمده از این تحقیق میتوان نتیجه گرفت که استفاده از سرمادرمانی موضعی اثری همانند داروهای کاهنده دما در بدن داشته و میتواند اثر مطلوب را ایجاد کند بدون اینکه اثر سیستمیک در بدن داشته و استفاده طولانی مدت آن آسیب رسان باشد و علاوه بر آن استفاده از آن به سهولت صورت گرفته و در دسترس می باشد و میتواند بعنوان درمان اولیه و همزمان با درمانهای دیگر بکار گرفته شود.</p>

مقدمه

کمبود اکسیژن متعاقب ایسکمی منجر به تغییرات زیان آوری در ساختار و عملکرد مغز میشود. مطالعات نشان داده که نیمی از مرگ و میر ناشی از ادم مغزی بوده و نقش بسزایی در مرگ نرونی و گسترش ضایعات مغزی دارد (۱-۳). کاهش یا قطع جریان خون به قسمتی از مغز منجر به ایجاد ایسکمی مغزی موضعی می شود (۴). ریپرفیوژن همچنین تشکیل رادیکال های آزاد را تسریع کرده و سبب اختلال در عملکرد میتوکندری، آسیب DNA و در نهایت مرگ سلول می شود (۵). مسیر مرگ

سلولی در هیپوکسی و ایسکمی مغزی از اهمیت بسزایی برخوردار می باشد. نکرور بعنوان مهمترین عامل برای این مسیر پذیرفته شده است. محققین دریافته اند که آپوپتوز نیز به اندازه نکرور در مرگ سلولی مغزی تاثیر دارد. تغییرات آپوپتوزی در مناطق مختلف مغز بعد از هیپوکسی گزارش شده است. مطالعات نشان داده است مهار مسیر آپوپتوزی ادم مغزی را کاهش میدهد (۴). کاهش التهاب، مهار آپوپتوزیس، ترمیم آکسونهای آسیب دیده و آنژیوژنز عواملی هستند که می توانند به ترمیم بافت عصبی در

نواحی آسیب دیده کمک کنند و عوارض ناشی از آن را کاهش دهند (۶) ادم مغزی، فشار داخل جمجمه را افزایش داده و منجر به فشردن عروق مغزی و کاهش خونرسانی به بافت مغز و گسترش ضایعه می شود (۶). سرمادرمانی با کاهش ادم و عوارض ناشی از ریپرفیوژن، صدمه سلولی را کاهش میدهد (۷-۱۰). هدف از این تحقیق بررسی اثر سرمادرمانی موضعی را بر روی هیپوکسی ناشی از انسداد عروق کاروتید در موش نر است.

روش کار

در این تحقیق از ۱۶ راس موش صحرایی نژاد ویستار نر با وزن ۲۵۰ گرم در دو گروه هیپوکسی و گروه سرمادرمانی استفاده شد. رت‌ها در آزمایشگاه حیوانات دانشگاه آجا نگهداری گشته و آب و غذا آزادانه در اختیار آنان قرار گرفت. دمای آزمایشگاه ۲۲-۲۵ درجه و رطوبت هوا ۴۵ درصد بود و سیکل ۱۲ ساعت روز و ۱۲ ساعت شب برای آنها رعایت گردید. موشهای صحرایی به دو گروه هیپوکسی و سرمادرمانی تقسیم شدند. برای بیهوشی از کلرال هیدرات با دوز ۴۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن استفاده شد که به صورت داخل صفاقی تزریق شد. شریان کاروتید داخلی سمت چپ بصورت موقت با نخ بخیه بسته شد تا جریان خون بمدت یک ساعت قطع گشته و اکسیژن رسانی مختل شود. پس از برقراری مجدد جریان خون، از کیسه یخ بر روی گردن موش صحرایی بمدت نیم ساعت استفاده شد. دمای بدن رت توسط دماسنج رکتال محاسبه گشت و موش صحرایی جهت مراقبت های ویژه در قفس جداگانه استریل قرار گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت رت ها ذبح شده و مغز جهت بررسی در فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت. نمونه ها پس از فیکساسیون با میکروتوم روتاری برش خورده و جهت رنگ آمیزی آماده

گشتند. نمونه ها با کرزبل ویوله رنگ آمیزی شده و سپس با دوربین دیجیتال canon با زوم اپتیکال ۱۰ عکس برداری صورت گرفت. برای اندازه گیری میزان ادم ابتدا عکسهای بافتی با زوم ۴ عکس برداری شده و توسط نرم افزار Image J مورد بررسی قرار گرفت. سپس، حجم ناحیه ضایعه (سمت چپ) را پس از محاسبه در ۲ (ضخامت) ضرب کرده تا حجم نیمکره ضایعه دیده محاسبه شود. حجم ناحیه سالم را هم محاسبه کرده و طبق فرمول زیر حساب می گردد (۱۱).

$$100 * [1 - (\text{حجم ناحیه راست} / \text{حجم ناحیه چپ})]$$

محاسبه حجم ضایعه: برای اندازه گیری حجم ضایعه از نرم افزار Image J استفاده شد و مساحت کورتکس ضایعه دیده در ضخامت ضرب گردید.

برای محاسبه سلولهای مرده در محل ضایعه با رنگ آمیزی نیسل و استفاده از نرم افزار Image J سلولهای مرده که دارای هسته تیره بودند شمارش شدند. نتایج تحقیق با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۲۲ و T test تجزیه و تحلیل شد. $P < 0.05$ از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

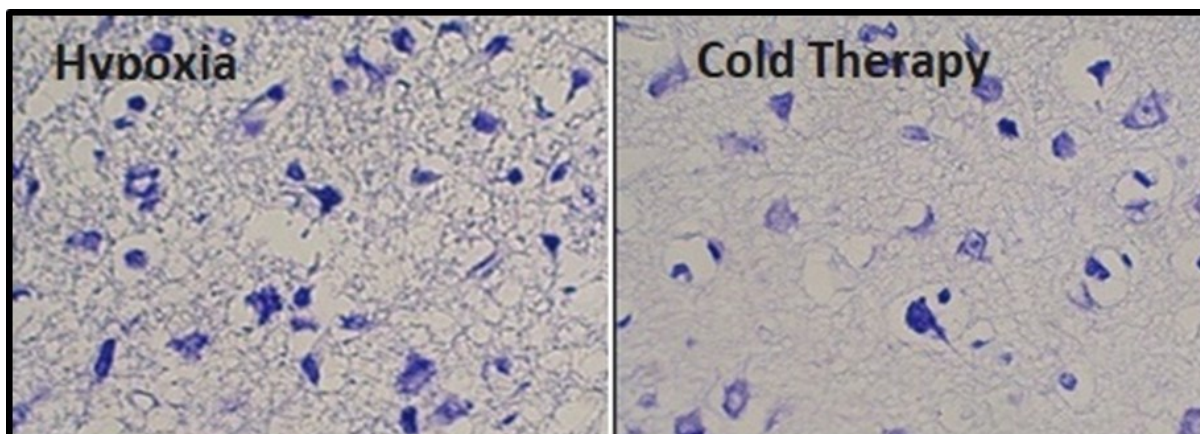
هیپوکسی و یا اختلال در خون رسانی به بافت مغز و کاهش اکسیژن سبب افزایش حجم در سمت ضایعه و در واقع ادم مغزی نسبت به سمت سالم گردید. استفاده از سرمادرمانی موضعی ادم مغزی را کاهش داده است (جدول شماره ۱). حجم ضایعه در گروه درمانی نسبت به گروه هیپوکسی بصورت معنی داری کاهش داشته است (جدول شماره ۲). سلولهای مرده در رنگ آمیزی نیسل در گروه هیپوکسی و درمانی در میکروگراف زیر دیده شده است (میکروگراف ۱). سلولهای مرده در تصویر گروه درمانی کاهش داشته و سلولهای نرمال بیشتر دیده میشود.

جدول ۱ - میزان ادم در گروه هیپوکسی و درمانی ($P < 0.05$)

انحراف معیار	میانگین	تعداد	گروه موش ها
۶/۰۷	۲۴/۱۳	۸	هیپوکسی
۰/۶۷	۲/۶۹	۸	سرما درمانی

جدول ۲ - حجم ضایعه در گروه هیپوکسی و درمانی ($P < 0.05$)

انحراف معیار	میانگین	تعداد	گروه موش ها
۸۴/۴۹	۲/۴۳	۸	گروه هیپوکسی
۱۵/۶	۱/۱۴	۸	سرما درمانی



بحث و نتیجه گیری

کاهش داده و متعاقب آن حجم ضایعه را نیز کاهش میدهد (۲۰) که با مطالعه ما همخوانی داشت.

در مطالعه حاضر، ادم مغزی محاسبه گردید که در گروه هیپوکسی افزایش یافته بود و استفاده از سرمادرمانی موضعی توانست آنرا به میزان قابل توجهی کاهش دهد. Choi در سال ۲۰۱۲ اعلام کرد سرمادرمانی با مهار دژنراسیون سد خونی مغزی و کاهش پاسخ های التهابی، ادم را در موش سوری کاهش میدهد که با نتایج ما در موش صحرائی همخوانی دارد (۱۹). در سال ۲۰۰۷ در مقاله مروری Bardutzky J و همکاران اعلام داشتند سرمادرمانی زمانی تاثیر دارد که در مراحل اولیه آسیب بکار رود و موجب کاهش پاسخ التهابی و در نهایت کاهش ادم میشود که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد (۲۱).

با استفاده از نتایج بدست آمده از این تحقیق میتوان نتیجه گرفت که استفاده از سرمادرمانی موضعی اثری همانند داروهای کاهنده دما در بدن داشته و میتواند اثر مطلوب را ایجاد کند بدون اینکه اثر سیستمیک در بدن داشته و استفاده طولانی مدت آن آسیب رسان باشد و علاوه بر آن قابلیت دسترسی به آن آسانتر از داروهای شیمیایی بوده و استفاده از آن به سهولت صورت میگیرد و میتواند بعنوان درمان اولیه و همزمان با درمانهای دیگر بکار گرفته شود (۲۲، ۲۳) مخصوصاً در مواردی که درمان های دیگر نمی تواند ادم و التهاب را کاهش دهد (۲۴، ۲۵).

نتایج این تحقیق نشان داده است که استفاده از سرمادرمانی موضعی حجم ضایعه و آسیب مغزی متعاقب آن را بواسطه کاهش عوارض ریپرفیوژن کاهش میدهد. از آنجایی که سرمادرمانی به اشکال مختلف مورد استفاده قرار میگیرد (۱۲) روشهای متفاوتی در حیوانات آزمایشگاهی وجود دارد که بصورت موضعی و استفاده دارویی می باشد.

محققین بسیاری برای کاهش اثر ضایعات ناشی از پاسخهای التهابی تروماها، ایسکمی مغزی و هیپوکسی و خونریزی مغزی، از داروهای کاهنده دمای بدن استفاده نمودند و نتایج آن کاهش حجم ضایعه و آسیب سلولی ناشی از آن بوده است (۱۳-۱۷). در سال ۲۰۱۰ Yenari و همکاران استفاده از سرمادرمانی جهت کاهش حجم ضایعه را بلا فاصله بعد از ضایعه موثر دانسته اند (۱۸). Choi, K.E. و همکاران در سال ۲۰۱۲ اعلام کردند که استفاده از سرمادرمانی در صورتی که در مراحل اولیه ضایعه و شروع ریپرفیوژن باشد تا ۴۰٪ حجم ضایعه را کاهش می دهد (۱۹). سرمادرمانی استفاده شده در این مطالعه که از نوع موضعی بوده است با کاهش ضایعه ریپرفیوژن و کاهش پاسخهای التهابی بر حجم ضایعه تاثیر گذاشته و آنرا کاهش می دهد.

Zgavc و همکاران در سال ۲۰۱۲ سرمادرمانی را بعنوان یک عامل مداخله گر درمانی معرفی نمودند که سلولهای آپوپتوزی را

References

- 1-Jin R, Yang G, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *Journal of leukocyte biology*. 2010;87(5):779-89.
- 2-Uluc K, Miranpuri A, Kujoth GC, Akture E, Baskaya MK. Focal cerebral ischemia model by endovascular suture occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2011(48).
- 3-Zador Z, Stiver S, Wang V, Manley GT. Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. *Handbook of experimental pharmacology*. 2009 (190):159-70.
- 4-Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in neurosciences*. 1999;22(9):391-7.
- 5-Dezema RA, Colli BO, Carlotti Junior CG, Tirapelli LF. Pre, intra and post-ischemic hypothermic neuroprotection in temporary focal cerebral ischemia in rats: morphometric analysis. *Arquivos de neuro-psiquiatria*. 2012;70(8):609-16.
- 6-Gu LJ, Xiong XX, Ito T, Lee J, Xu BH, Krams S, et al. Moderate Hypothermia Inhibits Brain Inflammation and Attenuates Stroke-Induced Immunodepression in Rats. *CNS neuroscience & therapeutics*. 2013.
- 7-Krieger DW, Yenari MA. Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: what do laboratory studies teach us? *Stroke*. 2004;35(6):1482-9.
- 8-Liu L, Yenari MA. Therapeutic hypothermia: neuroprotective mechanisms. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2007;12:816-25.
- 9-Alva N, Carbonell T, Palomeque J. Hypothermic protection in an acute hypoxia model in rats: Acid-base and oxidant/antioxidant profiles. *Resuscitation*. 2010;81(5):609-16.
- 10-Askalan R, Wang C, Shi H, Armstrong E, Yager JY. The effect of postischemic hypothermia on apoptotic cell death in the neonatal rat brain. *Developmental neuroscience*. 2011;33(3-4):320-9.
- 11-Strbian D, Karjalainen-Lindsberg ML, Tatlisumak T, Lindsberg PJ. Cerebral mast cells regulate early ischemic brain swelling and neutrophil accumulation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006;26(5):605-12.
- 12-van der Worp HB, Sena ES, Donnan GA, Howells DW, Macleod MR. Hypothermia in animal models of acute ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Brain : a journal of neurology*. 2007;130(Pt 12):3063-74.
- 13-Xue T-F, Ding X, Ji J, Yan H, Huang J-Y, Guo X-D, et al. PD149163 induces hypothermia to protect against brain injury in acute cerebral ischemic rats. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2017;135(3):105-13.
- 14-Ma J, Wang Z, Liu C, Shen H, Chen Z, Yin J, et al. Pramipexole-Induced Hypothermia Reduces Early Brain Injury via PI3K/AKT/GSK3 β pathway in Subarachnoid Hemorrhage rats. *Scientific Reports*. 2016;6:23817.
- 15-Miao Y-F, Wu H, Yang S-F, Dai J, Qiu Y-M, Tao Z-Y, et al. Adenosine Monophosphate-Induced Hypothermia Attenuates Brain Ischemia/Reperfusion Injury in a Rat Model by Inhibiting the Inflammatory Response. *Mediators of Inflammation*. 2015;2015:10.
- 16-Johansen FF, Hasseldam H, Rasmussen RS, Bisgaard AS, Bonfils PK, Poulsen SS, et al. Drug-induced hypothermia as beneficial treatment before and after cerebral ischemia. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 2014;81(1):42-52.
- 17-Zhang M, Li W, Niu G, Leak RK, Chen J, Zhang F. ATP induces mild hypothermia in rats but has a strikingly detrimental impact on focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33(1).
- 18-Yenari MA, Hemmen TM. Therapeutic hypothermia for brain ischemia: where have we come and where do we go? *Stroke*. 2010;41(10 Suppl):S72-4.
- 19-Choi KE, Hall CL, Sun JM, Wei L, Mohamad O, Dix TA, et al. A novel stroke therapy of pharmacologically induced hypothermia after focal cerebral ischemia in mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2012;26(7):2799-810.
- 20-Zgavc T, Ceulemans AG, Hachimi-Idrissi S, Kooijman R, Sarre S, Michotte Y. The neuroprotective effect of post ischemic brief mild hypothermic treatment correlates with apoptosis, but not with gliosis in endothelin-1 treated rats. *BMC neuroscience*. 2012;13:105.
- 21-Bardutzky J, Schwab S. Antiedema therapy in ischemic stroke. *Stroke*. 2007;38(11):3084-94.
- 22-Tang XN, Liu L, Yenari MA. Combination therapy with hypothermia for treatment of cerebral ischemia. *Journal of neurotrauma*. 2009;26(3):325-31.
- 23-Ghahari L, Safari M, Joghataei MT, Mehdizadeh M, Soleimani M. Effect of Combination Therapy Using Hypothermia and Granulocyte Colony-Stimulating Factor in a Rat Transient Middle Cerebral Artery Occlusion Model. *Iranian biomedical journal*. 2014;18(4):239-44.
- 24-Pasban E, Panahpour H, Vahdati A. Early oxygen therapy does not protect the brain from vasogenic edema following acute ischemic stroke in adult male rats. *Scientific Reports*. 2017;7(1):3221.
- Antezana DF, Clatterbuck RE, Alkayed NJ, Murphy SJ, Anderson LG, Frazier J, et al. High-dose ibuprofen for reduction of striatal infarcts during middle cerebral artery occlusion in rats. *Journal of neurosurgery*. 2003;98(4):860-6.

The effect of cryotherapy on inflammation and volume of post-hypoxic lesions in male rat

Nasrollah Zadeh (MD, Ph.D), Ghahari L (Ph.D)*, Safari M (Ph.D)

Abstract

Introduction: hypoxia result in harmful changes in brain structure and function. Reduction of inflammation, inhibition of apoptosis, repair of damaged axons and angiogenesis are factors that can Helps repair nerve tissue in damaged areas and reduce complications. Cryotherapy reduces cellular damage by decreasing edema and complications caused by reperfusion.

Methods: In this study, 16 male Wistar rats ,weighing 250 g, were used in two groups include hypoxia and treatment. For anesthesia, chloral hydrate was used IP at a dose of 400 mg / kg. The left carotid artery was temporarily interrupted for one hour and the oxygen supply was disrupted. By restarting the bloodstream, the ice pack is applied locally to the rat's neck for half an hour. After 24 hours, the rats were sacrificed and the samples were stained with cresyl violet. Then taken with Canon's digital camera. Cerebral edema, lesion volume and number of cell death were calculated and analyzed by SPSS software.

Results: Dead cells are reduced in the treatment group and normal cells are more likely to be seen. The use of topical cryotherapy has reduced brain edema. The volume of lesion in the treatment group was significantly lower than the hypoxia group.

Conclusion: The results of this study have shown that the use of topical cryotherapy reduces brain damage by reducing reperfusion complications. Using the results obtained from this study, it can be concluded that the use of topical cryotherapy has the same effect as drug that decrease in the body temperature but can produce a favorable effect without systemic effects in the body and its long-term use is harmful. In addition, it is easy to use and available and can be used as an initial treatment and at the same time as other treatments.

Keyword: Hypoxia, Ischemia, Brain, Cryotherapy, Rat

*Corresponding author, Department of anatomy, faculty of medicine, AJA University of medical sciences, Tehran, Iran. Email: 1-ghahari@razi.tums.ac.ir