

## تأثیر نانوذرات فولرن بر ضایعه مغز و تغییرات آسیب‌شناختی طی ایسکمی موضعی و گذرای مغز در موش صحرایی

مسیحا آریافر<sup>۱</sup>، محمدتقی محمدی<sup>۲\*</sup>

تاریخ دریافت ۱۳۹۵/۰۲/۲۰ تاریخ پذیرش ۱۳۹۵/۰۴/۱۹

### چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** بر طبق مطالعات اخیر، نانوذرات فولرن دارای یک ماهیت روشنی قوی برای رادیکال‌های آزاد در محیط‌های زیستی می‌باشند. از آنجایی که رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) یک مکانیسم پایه‌ای آسیب مغز در سکتة هستند، ما قصد داشتیم اثرات محافظت‌نورونی نانوذرات فولرن بر روی آسیب‌های مغزی ناشی از ایسکمی در مدل آزمایشگاهی سکتة مغزی را مورد مطالعه قرار دهیم.

**مواد و روش کار:** آزمایش در سه گروه موش صحرایی انجام شد (N=۲۸): شاهد، کنترل ایسکمی و ایسکمی درمان. ایسکمی از طریق انسداد شریان میانی مغز (MCAO) به مدت ۹۰ دقیقه و به دنبال آن ۲۴ ساعت خون‌رسانی مجدد انجام گردید. موش‌های صحرایی فولرن (داخل صفاقی، ۵ mg/kg) را ۶۰ دقیقه پیش از القاء MCAO دریافت کردند. حجم ضایعه قشر و استریاتوم (رنگ‌آمیزی TTC) و تغییرات آسیب‌شناختی ۲۴ ساعت پس از پایان MCAO بررسی شدند.

**یافته‌ها:** القاء MCAO سبب ایجاد ضایعه مغزی در نواحی قشر ( $3.07 \pm 1.16 \text{ mm}^3$ ) و استریاتوم ( $1.15 \pm 2.21 \text{ mm}^3$ ) به همراه آسیب‌های بافتی گردید. دریافت فولرن میزان ضایعه در نواحی قشر ( $1.66 \pm 1.15 \text{ mm}^3$ ) و استریاتوم ( $0.54 \pm 0.7 \text{ mm}^3$ ) را به‌طور معنی‌داری به میزان ۴۵٪ و ۵۳٪ کاهش داد. همچنین، فولرن درصد مرگ‌ومیر موش‌های صحرایی ایسکمی درمان شده (۳۳٪/۳۳٪) در مقایسه با ایسکمی درمان نشده (۹۰٪/۹۰٪) به همراه صدمات آسیب‌شناختی را کاهش داد.

**بحث و نتیجه‌گیری:** نتیجه‌گیری می‌شود که نانوذرات فولرن، به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی، به‌طور مؤثری آسیب‌های مغزی ناشی از ایسکمی را احتمالاً از طریق ماهیت روشنی رادیکال‌های آزاد کاهش داده و از تخریب نورونی جلوگیری می‌کند.

**کلیدواژه‌ها:** فولرن، استرس اکسیداتیو، ضایعه مغزی، تخریب نورونی، سکتة ایسکمی

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هفتم، شماره هشتم، ص ۶۸۲-۶۷۲، آبان ۱۳۹۵

آدرس مکاتبه: گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، تهران، ایران، تلفن: ۰۹۱۲۷۷۱۳۵۸۳

Email: Mohammadi.mohammadt@yahoo.com & Mohammadimohammadt@bmsu.ac.ir

### مقدمه

این اندامک باعث تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدهای غشای سلولی می‌شود (۶، ۷). مطالعات گسترده‌ای به نقش تولید بیش‌ازاندازه رادیکال‌های آزاد و بروز فرآیند استرس اکسیداتیو در آسیب‌های نورونی پس از ایسکمی مغز تأکید داشته‌اند (۸-۱۰). متابولیسم اکسیداتیو که برای بقای مغز ضروری بوده با تولید مقادیری از گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS) همراه است که در شرایط فیزیولوژیک این رادیکال‌ها توسط مکانیسم دفاع آنتی‌اکسیدانی از بافت مغز حذف شده و از آسیب به نورون‌ها جلوگیری می‌شود (۱۱). در طی پدیده ایسکمی مغز افزایش تولید بیش‌ازاندازه این رادیکال‌های آزاد به دلایل مختلف در مغز ایسکمی شده به وجود می‌آیند. یافته‌های مطالعات نشان می‌دهند بعد از

بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO) سکتة مغزی به‌عنوان دومین علت مرگ در دنیا طی دهه گذشته گزارش شده است و از مهم‌ترین دلایل ناتوانی‌های بزرگ‌سالان به شمار می‌رود (۱، ۲). عامل ایجاد سکتة مغزی انسداد جریان خون مغز بوده که منجر به توقف اکسیژن‌رسانی و مواد تغذیه‌ای به سلول‌های بافت مغز در ناحیه ایسکمی شده و در پی آن مجموعه‌ای از مسیرهای مخرب پیچیده سلولی فعال شده و در نهایت باعث مرگ نورونی و آسیب به بافت عصبی می‌گردد (۳-۵). کاهش خون‌رسانی به مغز از یک طرف باعث کاهش تولید ماده پراثری آدنوزین تری فسفات (ATP) به دلیل اختلال در عملکرد میتوکندری‌ها شده و از طرفی با آسیب در

<sup>۱</sup> دانشجوی، کارشناسی ارشد نانوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی تهران

<sup>۲</sup> دانشیار، فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (نویسنده مسئول)

استاندارد هستند. از آنجایی که نقش رادیکال‌های آزاد اکسیژن در تشدید آسیب‌های ناشی از سکته و ایسکمی‌های مغز به خوبی مشخص شده، مطالعه حاضر در نظر داشت تأثیر محافظت احتمالی نانوذرات فولرن از نوع هیدروکسیلیه (C<sub>60</sub>(OH)<sub>18-22</sub>) در مقابل آسیب‌های ناشی از سکته مغز در مدل تجربی ایسکمی موضعی و گذرای مغز در موش صحرایی را مورد مطالعه قرار دهد.

## مواد و روش کار

### حیوانات:

در این مطالعه که یک مطالعه مداخله‌ای-تجربی بود از ۲۸ سر موش صحرایی بالغ نر نژاد ویستار سالم و طبیعی که از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) در محدوده وزنی ۲۷۰ تا ۳۲۰ گرم خریداری می‌شدند استفاده گردید. حیوانات قبل از مطالعه و در طی آزمایش در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی، رطوبت مناسب، درجه حرارت ۲۵ °C و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. تمام آزمایش‌ها بر طبق مقررات اخلاقی کار با حیوانات، مصوب شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) انجام گردید.

### نحوه ایجاد ایسکمی مغزی:

برای آماده‌سازی حیوان جهت ایجاد ایسکمی موقتی-موضعی مغز از روش فیلامان داخل رگی استفاده گردید (۲۵). در ابتدا موش‌های صحرایی توسط ایزوفلوران ۲/۵ درصد (انگلستان) 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 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 نموده و هم‌زمان با بستن قسمت پائین آن نخ نایلون آماده شده (شماره ۰-۳) که نوک آن توسط حرارت گرد شده و سطح آن با پلی‌ال-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، مقاومت اندکی در هدایت آن ایجاد می‌شد. بعد از اطمینان از قرارگیری نخ آماده شده در محل موردنظر نخ نایلون به مدت ۹۰ دقیقه در محل تثبیت می‌شد. برای خاتمه ایسکمی و خون‌رسانی مجدد نخ نایلون را به آرامی از رگ بیرون آورده و با بستن شریان خارجی زخم‌های ایجاد شده در ناحیه گردن را بخیه زده و حیوان تا بهوش آمدن در محل گرم نگهداری می‌شد. در تمام دوره آزمایش تا خاتمه بیهوشی درجه حرارت حیوان با کمک لامپ گرم کننده در محدوده ۳۷-۳۸ درجه سانتی‌گراد ثابت نگه داشته شد. بعد از

ایسکمی مغز سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی این بافت تضعیف شده و حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن که به‌طور گسترده‌ای تولید می‌شوند دچار نقص می‌گردد (۱۲-۱۴). همچنین مشخص شده تعدادی آنزیم همچون NADPH-اکسیداز که تولیدکننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن هستند بعد از ایسکمی مغز میزان و فعالیت آن‌ها به‌طور فزاینده‌ای زیاد می‌گردد (۱۵). نهایتاً بافت مغز به دلیل دارا بودن اسیدهای چرب غیراشباع فراوان، مصرف اکسیژن بالا و فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی ضعیف در مقایسه با سایر بافت‌های بدن به آسانی مستعد استرس اکسیداتیو است (۱۲-۱۴).

نتایج مطالعات نشان می‌دهند برخی از نانوذرات کربن دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی در محیط‌های زیستی بوده و در این میان نانوذرات فولرن به دلیل برخی ماهیت‌های ویژه توجه محققین زیادی را در جلوگیری از آسیب‌های مختلف در شرایط پاتولوژیک که رادیکال‌های آزاد اکسیژن در آن نقش دارند را به خود جلب کرده است (۱۶، ۱۷). نانوذره فولرن (C<sub>60</sub>) که سومین آلوتروپ اتم‌های کربن با ساختاری کرولی است به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانی قوی در محیط‌های زیستی پیشنهاد شده و این نانوذره به آسانی الکترون‌های مربوط به رادیکال‌های آزاد را به سمت خود کشیده و با آن‌ها واکنش می‌دهد (۱۸). یافته‌های اخیر نشان می‌دهند فولرن قادر است با عمل کردن به‌عنوان یک "جاذب رادیکال آزاد"، رادیکال‌های آزاد گوناگون را حتی مؤثرتر از آنتی‌اکسیدان‌های درون سلولی حذف نماید (۱۹). با توجه به ساختمان غیر قطبی این ترکیب افزودن گروه‌های عاملی همچون کربوکسیل، هیدروکسیل یا آمین جهت افزایش حلالیت آن در محیط‌های آبی بسیار رایج است (۲۰). طبق نتایج مطالعات عامل‌دار کردن این ماده بخصوص با گروه‌های هیدروکسیل، میزان ماهیت روبشی رادیکال‌های آزاد این ترکیب را به‌طور فزاینده‌ای افزایش می‌دهد (۲۱). در چندین مطالعه خاصیت روبشی انواع رادیکال‌های آزاد توسط فولرن در محیط‌های زیستی به اثبات رسیده است. در تحقیقی Zha و همکاران نشان دادند این نانوذرات با خاصیت روبشی رادیکال‌های آزاد در محیط‌های کشت باعث محافظت نوروئین‌های هیپوکامپ در مقابل استرس اکسیداتیو می‌گردند (۲۲). در تحقیق دیگر Dugan و همکاران نشان دادند با حضور این نانوذرات در محیط کشت سلول‌های عصبی ناحیه قشر مغز از اثرات مسمومیت سلولی برخی اکسیدان‌ها و در نهایت آپوپتوز این سلول‌ها جلوگیری می‌شود (۲۳). نهایتاً، در یک مطالعه گزارش شده استفاده از فولرن از طریق تزریق درون‌بطنی مغز به میزان ۰/۳ mg/kg اثر حفاظتی در مقابل آسیب‌های ایسکمی-خون‌رسانی مجدد مغز دارد (۲۴).

بر اساس تحقیقات ارائه شده نانوذرات فولرن دارای خاصیت روبشی رادیکال‌های آزاد حتی قوی‌تر از برخی آنتی‌اکسیدان‌های



## یافته‌ها

## نتایج درصد مرگ‌ومیر:

جدول شماره ۱ تعداد نمونه‌ها برای هر گروه و میزان درصد مرگ‌ومیر حیوانات در طی پروسه جراحی را نشان می‌دهد. در حیوانات گروه شاهد به دلیل عدم ایسکمی مغز میزان مرگ‌ومیر برابر با صفر بود. در حیوانات گروه کنترل ایسکمی تعداد حیوانات تحت ایسکمی برابر با ۱۲ سر بود که ۴ سر از آن‌ها در طی مرحله خون‌رسانی مجدد تلف شدند. بنابراین درصد مرگ‌ومیر در حیوانات گروه کنترل ایسکمی برابر با ۳۳/۳۳ درصد می‌باشد. در صورتی که در حیوانات ایسکمی درمان شده با فولرن تعداد حیوانات ایسکمی شده برابر با ۱۱ سر بود که فقط یک مورد از آن‌ها در طی مرحله خون‌رسانی مجدد تلف شد. بنابراین درصد مرگ‌ومیر این گروه برابر با ۹/۰۹ درصد می‌باشد.

## نتایج حجم ضایعه مغزی:

شکل شماره ۱ مقاطع عرضی تهیه شده از بافت مغز با رنگ‌آمیزی TTC در گروه‌های شاهد، کنترل ایسکمی و ایسکمی درمان شده با فولرن را نشان می‌دهد. یکنواختی رنگ قرمز آجری تأییدی بر عدم وجود ضایعه بافتی در نیمکره راست و چپ گروه شاهد و نیمکره چپ گروه‌های ایسکمی درمان شده و نشده می‌باشد. القاء ایسکمی توانست ضایعه نسبتاً وسیعی در نواحی قشر و استریاتوم (زیر قشر) نیمکره ایسکمی شده ایجاد نماید (نواحی سفید رنگ). در حالی که میزان ضایعه ایجاد شده توسط فولرن در این نواحی در گروه ایسکمی درمان شده در مقایسه با گروه ایسکمی درمان نشده به مقدار قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت.

نمودار شماره ۱ مقادیر کمی حجم ضایعه مغزی در ناحیه قشر برحسب میلی‌متر مکعب در نیمکره ایسکمی (راست) گروه‌های ایسکمی و ایسکمی درمان شده با فولرن را نشان داده است. میانگین حجم ضایعه قشر در نیمکره ایسکمی شده حیوانات گروه ایسکمی

۳۰۷±۱۶ میلی‌متر مکعب بود که دریافت فولرن به میزان mg/kg ۵ قبل از القاء ایسکمی حجم ضایعه قشر را در گروه ایسکمی درمان شده به‌طور معنی‌داری کاهش داد ( $p < 0.01$ ) که میزان آن ۱۶۶±۱۵ میلی‌متر مکعب بود.

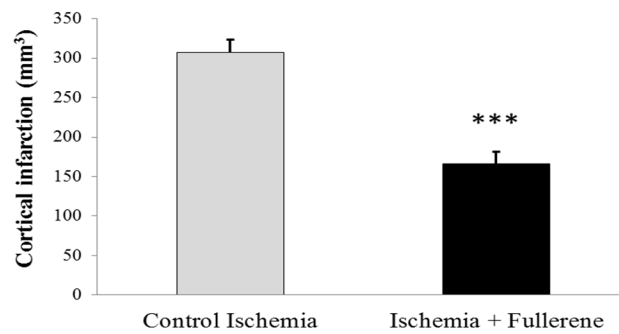
مقادیر کمی حجم ضایعه مغزی در ناحیه استریاتوم برحسب میلی‌متر مکعب در نیمکره ایسکمی گروه‌های ایسکمی و ایسکمی درمان شده با فولرن در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است. میانگین حجم ضایعه استریاتوم در نیمکره ایسکمی شده حیوانات گروه ایسکمی ۱۱۵±۲۱ میلی‌متر مکعب بود که دریافت فولرن به میزان mg/kg ۵ قبل از القاء ایسکمی حجم ضایعه استریاتوم را در گروه ایسکمی درمان شده به‌طور معنی‌داری کاهش داد ( $p < 0.01$ ) که میزان آن ۵۴±۷ میلی‌متر مکعب بود.

## نتایج آسیب‌شناختی بافت مغز:

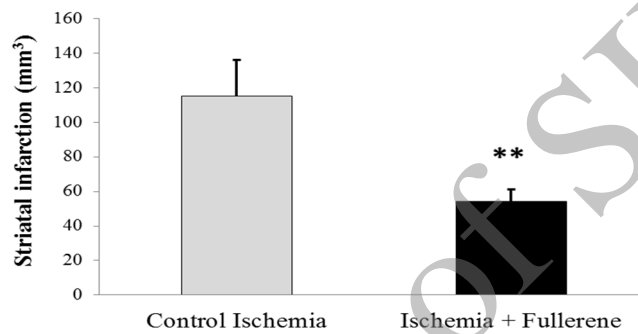
شکل شماره ۲ و ۳ بخش‌هایی از قشر و ناحیه استریاتوم (هیپوکامپ) نیمکره راست که تحت خون‌رسانی شریان میانی مغز می‌باشد را در گروه‌های آزمایشی نشان می‌دهد که با استفاده از کریزل ویوله رنگ‌آمیزی شده‌اند. نورون‌ها و سایر سلول‌های این ناحیه به همراه بافت عصبی آن در گروه شاهد سالم و طبیعی دیده می‌شوند (A). هسته این سلول‌ها با نظم خاصی در بافت پارانشیم مغز (نوروپیل) قرار گرفته‌اند. بررسی مقاطع تهیه شده حیوانات گروه کنترل ایسکمی نشان می‌دهد که در مقایسه با گروه شاهد تخریب نورونی به همراه واکنولیزه شدن بافت عصبی در ناحیه قشر و استریاتوم به مقدار زیادی صورت گرفته و چروکیدگی و متراکم بودن هسته‌ها نشان‌دهنده نورون‌های پیکنوت و نکروز شده می‌باشند (B). در صورتی که در حیوانات تیمار شده دریافت فولرن قبل از ایسکمی آسیب‌های نام برده را به مقدار زیادی کاهش داده است. به‌طوری که وضعیت نورون‌ها و بافت عصبی همانند حیوانات گروه شاهد طبیعی به نظر می‌رسند (C).

جدول (۱): میزان مرگ‌ومیر که به‌صورت درصد در هر گروه بیان شده است

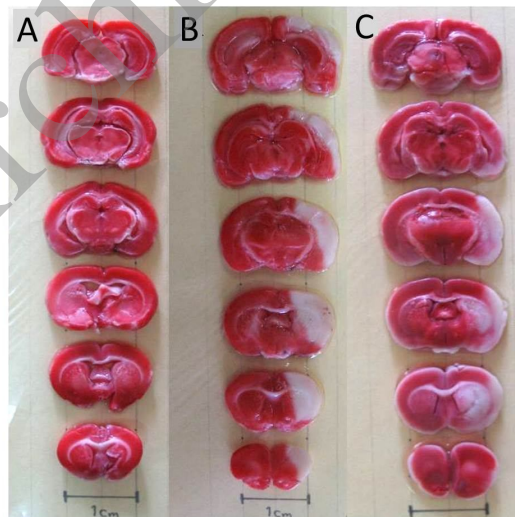
گروه	تعداد جراحی شده	تعداد نمونه‌های مانده	تعداد نمونه‌های زنده شده	تعداد نمونه‌های تلف شده	درصد مرگ‌ومیر
شاهد	۵	۵	۵	۰	۰
کنترل ایسکمی	۱۲	۸	۴	۰	۳۳/۳۳
ایسکمی درمان شده	۱۱	۱۰	۱	۰	۹/۰۹



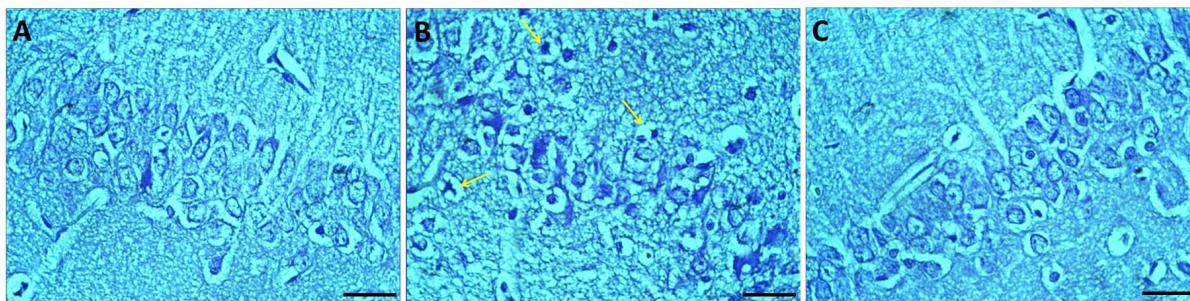
**نمودار (۱):** مقادیر کمی حجم ضایعه قشر برحسب میلی‌متر مکعب (mm<sup>3</sup>) ۲۴ ساعت پس از خون‌رسانی مجدد در گروه کنترل ایسکمی و ایسکمی درمان شده با فولرن (۵ mg/kg). داده‌ها به صورت Mean±SEM نشان داده شده است. \*\*\* نشانگر تفاوت معنی‌دار با  $p < 0.001$  در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی



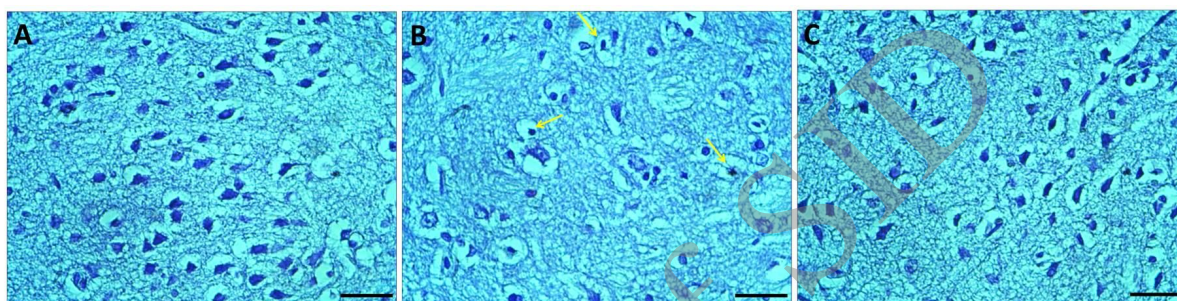
**نمودار (۲):** مقادیر کمی حجم ضایعه استریاتوم برحسب میلی‌متر مکعب (mm<sup>3</sup>) ۲۴ ساعت پس از خون‌رسانی مجدد در گروه کنترل ایسکمی و ایسکمی درمان شده با فولرن (۵ mg/kg). داده‌ها به صورت Mean±SEM نشان داده شده است. \*\* نشانگر تفاوت معنی‌دار با  $p < 0.01$  در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی



**تصویر (۱):** برش‌های تهیه شده از مقاطع عرضی مغز ۲۴ ساعت پس از جراحی در گروه شاهد (A) و ۲۴ ساعت پس از خون‌رسانی مجدد در گروه کنترل ایسکمی (B) و ایسکمی درمان شده با فولرن (C). برش‌ها با شیوه رنگ‌آمیزی TTC رنگ‌آمیزی شده که ناحیه ایسکمی به رنگ سفید و ناحیه ایسکمی نشده به رنگ قرمز دیده می‌شود.



**تصویر (۲):** مقاطع عرضی ناحیه قشر دندانه‌ای هیپوکامپ ۲۴ ساعت پس از جراحی در گروه شاهد (A) و ۲۴ ساعت پس از خون‌رسانی مجدد در گروه کنترل ایسکمی (B) و ایسکمی درمان شده با فولرن (C) با روش رنگ‌آمیزی کریزل ویوله. نوک پیکان نشان‌دهنده نورون‌های آسیب دیده است. (X400, Scale bars= 30 μm)



**تصویر (۳):** مقاطع عرضی ناحیه قشر مغز ۲۴ ساعت پس از جراحی در گروه شاهد (A) و ۲۴ ساعت پس از خون‌رسانی مجدد در گروه کنترل ایسکمی (B) و ایسکمی درمان شده با فولرن (C) با روش رنگ‌آمیزی کریزل ویوله. نوک پیکان نشان‌دهنده نورون‌های آسیب دیده است. (X400, Scale bars= 30 μm)

## بحث و نتیجه‌گیری

گونه‌های آزاد اکسیژن (ROS) دسته مهمی از رادیکال‌های آزاد هستند که نقش کلیدی در پاتوفیزیولوژی بیماری‌های نورودژنراتیو (تخریب نورونی) مغز به‌ویژه سکت‌های مغز دارند (۶، ۷). بر پایه نتایج اخیر برخی از نانوذرات کربن دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی هستند که در این میان نانوذرات فولرن به دلیل دارا بودن این ماهیت توجه محققین زیادی را در جلوگیری از آسیب‌های ایسکمی مغز که گونه‌های آزاد اکسیژن در پاتوژنز این اختلال نقش اساسی دارند را به خود معطوف کرده است (۱۲، ۱۳). بدین منظور مطالعه حاضر جهت بررسی اثرات محافظت احتمالی این نانوذرات بر ایسکمی مغز طراحی گردید. در این تحقیق استفاده از نانوذرات فولرن قبل از آغاز ایسکمی مغز توانست آسیب‌های ناشی از ایسکمی-خون‌رسانی مجدد مغز من‌جمله حجم ضایعه مغزی را به مقدار زیادی در نواحی قشر و استریاتوم (زیر قشر) کاهش دهد. همچنین استفاده از این نانوذرات باعث کاهش میزان تغییرات آسیب‌شناختی نورون‌ها به دنبال ایسکمی مغز هم در ناحیه قشر و هم استریاتوم (قشر دندانه‌ای هیپوکامپ) گردید. نهایتاً، فولرن درصد

مرگ‌ومیر حیوانات ایسکمی درمان شده را به مقدار زیادی کاهش داد.

در مطالعه حاضر انسداد شریان میانی مغز به مدت ۹۰ دقیقه توانست ضایعه گسترده‌ای هم در ناحیه قشر و هم زیر قشر ایجاد نماید. بر پایه مطالعات مسیرها و سیگنال‌های مخرب سلولی متعددی در ناحیه ایسکمی شده چه در حین ایسکمی و چه در مرحله خون‌رسانی مجدد فعال شده که منجر به صدمه در نورون‌ها و تخریب بافت عصبی می‌گردد (۴، ۲۷). نتایج بررسی آسیب‌شناختی بافت مغز هم در ناحیه قشر و هم استریاتوم مؤید این است که ایسکمی القاشده در مطالعه حاضر باعث صدمه به نورون‌ها و بافت مغز شده که تصاویر به‌دست‌آمده به‌خوبی این آسیب‌ها را نشان می‌دهد. مطالعه Ghosh و همکاران نشان می‌دهد القاء ایسکمی-خون‌رسانی مجدد مغز که با افزایش ROS همراه است باعث کاهش چشمگیر تعداد نورون‌های مناطق مختلف هیپوکامپ می‌گردد (۲۸). بعلاوه تغییرات آسیب‌شناختی گوناگونی همچون تشکیل نورون‌های اسیدوفیل با هسته متراکم، چروکیده و تیره‌تر از حالت طبیعی (نورون‌های Ghost) در مطالعات متعدد از نمونه‌های مغز حیوانات با مدل آزمایشگاهی سکت مغزی گزارش شده است

فولرن با کاهش رادیکال‌های آزاد نیتروژن در محیط کشت از سلول‌های فنوکروموسیت‌ها محافظت می‌کند (۳۵). گزارش شده مشتقات پلی هیدروکسیله این نانوذرات از نقص عملکرد میتوکندری و نهایتاً آزادسازی انواع رادیکال‌های آزاد از این اندامک جلوگیری کرده است (۲۱). همچنین Ye و همکاران نشان دادند استفاده از فولرن‌های پلی‌هیدروکسیله سبب کاهش میزان آپوپتوز و مرگ سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو می‌شود (۳۶). نهایتاً در چند مطالعه مشخص شد که مشتقات مختلف این نانوذرات دارای فعالیت ضدالتهابی قوی در برخی شرایط پاتولوژیک هستند (۳۷، ۳۸). همان‌طور که در پاراگراف قبلی به‌خوبی در ارتباط با نقش تولید رادیکال‌های آزاد در ارتباط با آسیب‌های ناشی از ایسکمی-خون‌رسانی مجدد به‌طور مفصل بحث گردید و از طرفی دیگر خاصیت روبشی و حذف رادیکال‌های آزاد توسط این ترکیب و حتی در مواردی اثرات ضدالتهابی در مطالعات ذکر شده ارائه گردید می‌توان نتیجه‌گیری کرد در مطالعه حاضر نیز این ترکیب با خاصیت روبشی قوی خود توانسته رادیکال‌های آزاد تولیدشده را در مناطق ایسکمی حذف کرده و با کاهش اثرات سمی این رادیکال‌ها و کاهش التهاب باعث کاهش حجم ضایعه، کاهش تغییرات آسیب‌شناختی و نهایتاً کاهش مرگ‌ومیر حیوانات دچار ایسکمی شده است.

بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر نانوذرات فولرن به‌ویژه نوع هیدروکسیله آن به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای آسیب‌های ناشی از ایسکمی مغز از جمله حجم ضایعه و تغییرات آسیب‌شناختی بافت مغز را کاهش داده و باعث کاهش مرگ‌ومیر ناشی از سکتته مغزی می‌گردد. به نظر می‌رسد ماهیت روبشی رادیکال‌های آزاد توسط این نانوذرات در کاهش آسیب‌های ناشی از ایسکمی مغز عامل اصلی اثرات مفید این ترکیب باشد. بر این اساس شاید در آینده نزدیک بتوان از ترکیبات محلول در آب این نانوذرات در پیشگیری یا کاهش عوارض سکتته مغزی استفاده کرد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد می‌باشد. بدین‌وسیله از گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله که مقدمات و وسایل موردنیاز این تحقیق را فراهم نموده قدردانی می‌شود. همچنین از کارشناس گروه مربوطه سرکار خانم کفایت بغلانی که در انجام پروژه حاضر ما را یاری کردند صمیمانه تشکر می‌گردد.

(۲۹، ۳۰). در مطالعه حاضر نیز تغییرات آسیب‌شناختی ذکرشده به همراه واکنش‌ها و واکنش‌ها شدن بافت مغز و همچنین کاهش محسوس تعداد نورون‌های قشر و هیپوکامپ ۲۴ ساعت پس از القاء ایسکمی مشاهده شد. مطالعات عوامل متعددی را در ایجاد این آسیب‌ها در سکتته مغزی دخیل می‌دانند که از مهم‌ترین این عوامل می‌توان به فعال شدن پاسخ‌های التهابی، اختلال تعادل یونی و تورم سلولی، اسیدوز و آزاد شدن نوروترانسمیترهای تحریکی و سمیت ناشی از تحریک بیش‌ازحد اشاره کرد (۳۱-۳۳). یکی دیگر از عوامل مهم تأثیرگذار بر آسیب‌های ناشی از سکتته مغزی، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در حین ایسکمی مغزی به‌ویژه در مرحله خون‌رسانی مجدد است (۱۲-۱۴). بعد از ایسکمی مغز سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی مغز تضعیف شده (کاهش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و گلوکاتایون پراکسیداز) و حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولیدشده دچار نقص می‌گردد (۱۲-۱۴). افزایش تولید این رادیکال‌های اکسیژن به شیوه‌های متعدد سبب تشدید ضایعه مغزی می‌شود. اتصال این رادیکال‌ها بخصوص رادیکال هیدروکسیل به اسیدهای نوکلئیک باعث صدمه به ساختار این ماکرومولکول می‌گردد (۶، ۷). بعلاوه، چربی‌های بافت مغز به دلیل دارا بودن اسیدهای چرب غیراشباع فراوان، مصرف اکسیژن بالای مغز و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پایین در مقایسه با سایر بافت‌های بدن به‌آسانی تحت پراکسیداسیون قرار می‌گیرند (۶، ۷). نهایتاً، افزایش این رادیکال‌ها از طریق مسیرهای متعدد باعث افزایش آپوپتوز و مرگ سلولی می‌گردد (۳۴).

در مطالعه حاضر تیمار با نانوذره فولرن قبل از القاء ایسکمی توانست حجم ضایعه مغز را به‌طور قابل‌ملاحظه هم در ناحیه قشر و هم زیر قشر کاهش دهد. همین‌طور در بررسی‌های آسیب‌شناختی مشخص شد موازی با کاهش حجم ضایعه استفاده از این ترکیب میزان آسیب به نورون‌ها و بافت عصبی را به مقدار زیادی کاهش داده است. مطالعات انجام شده اخیر خاصیت روبشی انواع رادیکال‌های آزاد توسط این نانوذره را به‌خوبی در شرایط vivo و vitro به اثبات رسانده‌اند (۱۲، ۱۳). نتایج مطالعه Tsai و همکاران نشان می‌دهد استفاده از مشتقات نانوذرات فولرن نورون‌های هیپوکامپ را در مقابل رادیکال‌های آزاد سوپراکسید حفاظت کرده به‌طوری‌که به دلیل واکنش بالای فولرن و مشتقات آن با رادیکال‌های آزاد به‌عنوان یک کاندیدای مناسب جهت کاهش انواع رادیکال‌ها در سیستم‌های زیستی معرفی شده است (۱۳). در مطالعه دیگر Hu و همکاران نشان دادند استفاده از مشتقات محلول در آب

## References:

1. Schweizer S, Meisel A, Marschenz S. Epigenetic mechanisms in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013;33(9): 1335-46.
2. Mogensen UB, Olsen TS, Andersen KK, Gerds TA. Cause-specific mortality after stroke: relation to age, sex, stroke severity, and risk factors in a 10-year follow-up study. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2013;22(7): 59-65.
3. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999;22(9): 391-7.
4. Maddahi A, Edvinsson L. Cerebral ischemia induces microvascular pro-inflammatory cytokine expression via the MEK/ERK pathway. *J Neuroinflammation* 2010;7: 14.
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. 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.
7. 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.
8. Allen CL, Bayraktutan U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *Int J Stroke* 2009;4: 461-70.
9. Niizuma K, Endo H, Chan PH. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. *J Neurochem* 2009;109(1): 133-8.
10. Sharma T, Airao V, Panara N. Solasodine protects rat brain against ischemia/reperfusion injury through its antioxidant activity. *Eur J Pharmacol* 2014 15;725: 40-6.
11. Wang Z, Liu T, Gan L. Shikonin protects mouse brain against cerebral ischemia/reperfusion injury through its antioxidant activity. *Eur J Pharmacol* 2010;643(2-3): 211-7.
12. Lai H-S, Chen Y, Chen W-J, ChangK-J, Chiang L-Y. Free Radical Scavenging Activity of Fullerenol on Grafts After Small Bowel Transplantation in Dogs. *Transplantation Proceedings* 2000;32: 1272-4.
13. Tsai M-C, Chen, Y.H, Chiang L.Y. Polyhydroxylated C60, Fullerenol, a Novel Free-radical Trapper, Prevented Hydrogen Peroxide- and Cumene Hydroperoxide-elicited Changes in Rat Hippocampus In-vitro. *J Pharm Pharmacol* 1997;49(4): 438-45.
14. Zini I, Tomasi A, Grimaldi R, Vannini V, Agnati LF. Detection of free radicals during brain ischemia and reperfusion by spin trapping and microdialysis. *Neurosci Lett* 1992;138(2): 279-82.
15. Yoshioka H, Niizuma K, Katsu M. NADPH oxidase mediates striatal neuronal injury after transient global cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011;31(3): 868-80.
16. 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.
17. Lens M, Medenica L, Citernesi U. Antioxidative capacity of C(60) (buckminsterfullerene) and newly synthesized fulleropyrrolidine derivatives encapsulated in liposomes. *Biotechnol Appl Biochem* 2008;51(3): 135-40.
18. Yin JJ, Lao F, Fu PP. The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials. *Biomaterials* 2009;30(4): 611-21.



19. Chistyakov VA, Smirnova YO, Prazdnova EV, Soldatov AV. Possible mechanisms of fullerene C(60) antioxidant action. *Biomed Res Int* 2013;2013: 821498.
20. Injac R, Prijatelj M, Strukelj B. Fullerenol nanoparticles: toxicity and antioxidant activity. *Methods Mol Biol* 2013;1028: 75-100.
21. Cai X, Jia H, Liu Z. 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.
22. Zha Y-y, Yang B, Tang M-l. Concentration-dependent effects of fullerenol on cultured hippocampal neuron viability. *Int J Nanomedicine* 2012;7: 3099.
23. Dugan LL, Gabrielsen JK, Yu SP, Lin TS, Choi DW. Buckminsterfullerenol free radical scavengers reduce excitotoxic and apoptotic death of cultured cortical neurons. *Neurobiol Dis* 1996;3(2): 129-35.
24. Lin AM, Fang SF, Lin SZ, Chou CK, Luh TY, Ho LT. Local carboxyfullerene protects cortical infarction in rat brain. *Neurosci Res* 2002;43(4): 317-21.
25. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989;20(1): 84-91.
26. Mohammadi MT, Dehghani GA. Nitric oxide as a regulatory factor for aquaporin-1 and 4 gene expression following brain ischemia/reperfusion injury in rat. *Pathol Res Pract* 2015;211(1): 43-9.
27. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 2008;55(3): 310-8.
28. Aparajita Ghosh A, Sarkar S, Mandal AK, Das N. Neuroprotective Role of Nanoencapsulated Quercetin in Combating Ischemia-Reperfusion Induced Neuronal Damage in Young and Aged Rats. *PLOS ONE* 2013;8(4): e57735.
29. Lee JC, Ahn JH, Lee DH. Neuronal damage and gliosis in the somatosensory cortex induced by various durations of transient cerebral ischemia in gerbils. *Brain Res* 2013;1510: 78-88.
30. Yan BC, Ohk TG, Ahn JH, 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.
31. 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.
32. Lee S, Chu HX, Kim HA. Effect of a broad-specificity chemokine-binding protein on brain leukocyte infiltration and infarct development. *Stroke* 2015;46(2): 537-44.
33. Posada-Duque RA, Barreto GE, Cardona-Gomez GP. Protection after stroke: cellular effectors of neurovascular unit integrity. *Front Cell Neurosci* 2014;8: 231.
34. Sharipov RR, Kotsiuruba AV, Kop"iak BS, Sahach VF. Induction of nitrosative stress in mitochondria of rats hearts in experimental ischemia-reperfusion of the brain and its correction by ecdysterone. *Fiziol Zh* 2014;60(5): 3-13.
35. Hu Z, Huang Y, Guan W, Zhang J, Wang F, Zhao L. The protective activities of water-soluble C(60) derivatives against nitric oxide-induced cytotoxicity in rat pheochromocytoma cells. *Biomaterials* 2010;31(34): 8872-81.
36. Ye S, Chen M, Jiang Y. Polyhydroxylated fullerene attenuates oxidative stress-induced apoptosis via a fortifying Nrf2-regulated cellular antioxidant

- defence system. *Int J Nanomedicine* 2014;9: 2073-87.
37. Dragojevic-Simic V, Jacevic V, Dobric S. Anti-inflammatory activity of fullereneol C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> nano-particles in a model of acute inflammation in rats. *DJNB* 2011;6(2): 819-27.
38. Fluri F, Grunstein D, Cam E. Fullerenols and glucosamine fullerenes reduce infarct volume and cerebral inflammation after ischemic stroke in normotensive and hypertensive rats. *Exp Neurol* 2015;265: 142-51.

Archive of SID

## EFFECT OF FULLERENE NANOPARTICLES ON BRAIN INFARCTION AND HISTOPATHOLOGICAL CHANGES DURING TRANSIENT AND FOCAL CEREBRAL ISCHEMIA IN RAT

Masiha Aryafar<sup>1</sup>, Mohammad Taghi Mohammadi<sup>1\*</sup>

Received: 10 May, 2016; Accepted: 10 Jul, 2016

### Abstract

**Background & Aims:** According to the recent studies, fullerene nanoparticles have a potent scavenging property for free radicals in biological environments. Since reactive oxygen species (ROS) is a fundamental mechanism of brain damage in stroke, we aimed to evaluate the neuroprotective effects of fullerene nanoparticles on ischemia-induced brain injuries in experimental model of stroke.

**Materials & Methods:** Experiment was performed in three groups of rats (N=28): Sham, Control ischemia, and Ischemic treatment. Ischemia was induced by 90 min middle cerebral artery occlusion (MCAO) followed by 24 hours reperfusion. Rats received fullerene (5 mg/kg, intraperitoneally) 60 min before induction of MCAO. Cortical and striatal infarction (TTC staining), and histopathological alterations were assessed 24 hours after termination of MCAO.

**Results:** MCAO induced brain infarction in cortical (307±16 mm<sup>3</sup>) and striatal (115±21 mm<sup>3</sup>) areas concomitant increase the histopathological damages. Administration of fullerene significantly reduced the infarction in cortical (166±15 mm<sup>3</sup>) and striatal (54±7 mm<sup>3</sup>) areas 45% and 53%, respectively. Also, fullerene decreased the mortality rate of ischemic treated rats (33.33%) compared to ischemic non-treated rats (9.09%) in accompany with the reduction of histopathological damages.

**Conclusion:** It is concluded that fullerene nanoparticles, as a potent antioxidant factor, effectively reduce ischemia-induced brain damage and prevent neurodegeneration possibly through scavenging property of free radicals.

**Keywords:** Fullerene, Oxidative stress, Brain infarction, Neurodegeneration, Ischemic stroke

**Address:** Department of Physiology and Biophysics, School of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**Tel:** +989127713583

**Email:** Mohammadimohammadt@bmsu.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2016; 27(8): 682 ISSN: 1027-3727

<sup>1</sup> MSc Student, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran (Corresponding Author)