

Neuroprotective Effects of Fullerenol against Reperfusion Injuries after Focal Transient Cerebral Ischemia in Rat

Shamsi Darabi¹, Mohammad Taghi Mohammadi², Ali Noroozzadeh¹

¹ Assistant Professor, Department of Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Associate Professor, Department of Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received January 6, 2016 ; Accepted August 22, 2016)

Abstract

Background and purpose: Overproduction of free radicals after brain ischemia exacerbates brain infarction and edema specifically during early reperfusion. The scavenging property of water-soluble fullerene derivatives is proven, so, the aim of this study was to evaluate the effects of fullerenol nanoparticles on brain infarction and edema, especially oxidative damages during reperfusion in an experimental model of stroke.

Materials and methods: The experiment was performed by three groups of rats (n=24): sham, control ischemia, and ischemic treatment. Brain ischemia was induced by 90 min middle cerebral artery occlusion (MCAO) followed by 24 hours reperfusion. The rats received fullerenol (10 mg/kg IP) immediately after termination of MCAO. Neurological deficit score (NDS), infarct volume, brain edema, and brain content of malondialdehyde (MDA) were assessed 24 hours after termination of MCAO.

Results: MCAO induced neurological dysfunction (3.20 ± 0.20), brain infarction ($527 \pm 59 \text{ mm}^3$), and brain edema ($3.83 \pm 0.53\%$) in control ischemic group. The content of MDA increased in ischemic brain ($5.30 \pm 0.11 \mu\text{g}/\text{mg}$ protein) compared with that in non-ischemic brain ($0.74 \pm 0.34 \mu\text{g}/\text{mg}$ protein). Administration of fullerenol in ischemic treated rats significantly reduced neurological dysfunction (2.01 ± 0.22), brain infarction ($106 \pm 33 \text{ mm}^3$) and brain edema ($1.70 \pm 0.74\%$). Also, fullerenol decreased the MDA content of ischemic treatment group ($0.78 \pm 0.16 \mu\text{g}/\text{mg}$ protein) compared with that of the control ischemic group.

Conclusion: Our findings indicate that fullerenol nanoparticles, as a potent antioxidant, effectively reduce reperfusion-induced brain injury and brain edema possibly through scavenging property of free radicals.

Keywords: ischemic stroke, fullerenol, oxidative stress, brain infarction, brain edema

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26 (144): 250-264 (Persian).

بررسی اثرات محافظت نوروئی فولرنول در مقابل آسیب های خونرسانی مجدد بعد از ایسکمی موضعی گذرای مغز در موش صحرایی

شمسی دارابی^۱ محمدتقی محمدی^۲ علی نوروززاده^۱

چکیده

سابقه و هدف: تولید گسترده رادیکال های آزاد بعد از ایسکمی مغز بویژه در اوایل خونرسانی مجدد سبب تشدید ضایعه و ادم مغزی می گردد. از آنجایی که ماهیت روبشی مشتقات محلول در آب فولرنول به اثبات رسیده است، هدف از تحقیق حاضر بررسی تاثیرات نانوذرات فولرنول بر ضایعه و ادم مغزی بویژه آسیب های اکسیداتیو طی خونرسانی مجدد در مدل تجربی سکنه بود.

مواد و روش ها: آزمایش توسط سه گروه از موش های صحرایی انجام شد (N=۲۴): شاهد، کنترل ایسکمی، ایسکمی درمان. ایسکمی مغز از طریق انسداد شریان میانی مغز (Middle Cerebral Artery Occlusion: MCAO) به مدت ۹۰ دقیقه و به دنبال آن ۲۴ ساعت خونرسانی مجدد انجام گردید. موش های صحرایی فولرنول ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی بلافاصله بعد از پایان MCAO دریافت کردند. شاخص اختلالات عصبی، حجم ضایعه مغز، ادم مغزی و مقدار مالون دی آلدئید (Malondialdehyde MDA) مغز ۲۴ ساعت پس از پایان MCAO بررسی شدند.

یافته ها: القاء MCAO سبب ایجاد اختلالات عصبی (۳/۲۰±۰/۲۰) و ضایعه مغزی (۵۲۷±۵۹mm³) در گروه کنترل ایسکمی به همراه ادم مغزی (۳/۸۳±۰/۵۳%) گردید. همچنین مقدار MDA در مغز ایسکمی (۵/۳۰±۰/۱۱μg/mg protein) در مقایسه با مغز غیرایسکمی افزایش یافت (۰/۷۴±۰/۳۴μg/mg protein). دریافت فولرنول در موش های ایسکمی درمان، اختلالات عصبی (۲/۰۱±۰/۲۲)، ضایعه (۱/۰۶±۳۳mm³) و ادم مغزی (۱/۷۰±۰/۷۴%) را به طور معنی داری کاهش داد. همچنین فولرنول مقدار MDA گروه ایسکمی درمان (۰/۷۸±۰/۱۶μg/mg protein) در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی را کاهش داد.

استنتاج: یافته های ما نشان می دهد نانوذرات فولرنول، به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی، به طور مؤثری آسیب های مغزی ناشی از خونرسانی مجدد و ادم مغز را احتمالاً از طریق ماهیت روبشی رادیکال های آزاد کاهش می دهد.

واژه های کلیدی: سکنه ایسکمی، فولرنول، استرس اکسیداتیو، ضایعه مغزی، ادم مغزی

مقدمه

دلایل ایجاد ناتوانی های متعدد از جمله فلج شدن قسمتی از بدن، اختلال در حافظه و صحبت کردن دچار مشکلات فراوان برای ادامه زندگی خود می شوند و هزینه های زیادی را به خانواده و جامعه تحمیل می نمایند (۳). بیش تر سکنه های

سکنه مغزی از مهم ترین اختلالات عروقی مغز است که پس از سرطان و بیماری های قلبی سومین عامل مرگ و میر در کشورهای صنعتی محسوب می گردد (۱، ۲). افراد پس از بروز سکنه مغزی در صورت زنده ماندن به

مؤلف مسئول: محمدتقی محمدی - دانشیار گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران Email: Mohammadi.mohammadt@yahoo.com

۱. استادیار، گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

۲. دانشیار، گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۱۱/۳ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۶/۱

مغزی از نوع ایسکمی بوده (۸۰ تا ۸۵ درصد) و بقیه موارد از نوع خونریزی شونده (هموراژیک) هستند (۴). سخته مغزی از نوع ایسکمی با کاهش شدید و قطع موقتی جریان خون در یک ناحیه از مغز همراه است که به علت انسداد یکی از شریان های اصلی تغذیه ای مغز بوجود آمده و مانع رساندن اکسیژن و مواد متابولیکی مورد نیاز و همچنین برداشت مواد زائد از بافت مغز می گردد (۵). تولید انواع رادیکال های آزاد نقش بسیار کلیدی در آسیب های مرحله خونرسانی مجدد دارد (۶،۷). از بین این رادیکال ها می توان به گونه های آزاد اکسیژن (Reactive oxygen species: ROS) و رادیکال های آزاد نیتروژن (نیتریک اکساید) اشاره نمود که موجب صدمه به ماکرومولکول های حیاتی سلول نظیر پروتئین ها، لیپید های غشاء و اسید های نوکلئیک می شوند (۸،۹). افزایش این رادیکال ها در مرحله خونرسانی مجدد سبب افزایش نفوذ پذیری غشاء میتوکندری می شود که از یک طرف سبب نارسایی در تولید انرژی سلول ها می شود و از طرفی دیگر باعث آزاد سازی فاکتور های مرگ سلولی (آپوپتوز) همچون سیتوکروم c شده که باعث آغاز مرگ نورون ها خواهد شد (۵،۱۰). همچنین این رادیکال ها از طریق تغییر در بیان برخی از پروتئین های اختصاصی سیستم سد خونی مغزی منجر به ادم مغزی می شود که در نهایت منجر به تشدید ضایعه ناشی از سخته مغزی می گردد (۱۱-۱۳).

مطالعات قبلی نشان می دهند کاهش میزان رادیکال های آزاد با کاهش میزان ضایعه ناشی از سخته مغزی همراه است (۱۴،۱۵). به این منظور روش های متعددی برای کاهش این رادیکال ها پیشنهاد شده که می توان به مهار تولید، برداشت و جمع آوری آن ها از محیط سلول ها و در نهایت تخریب و حذف این رادیکال ها توسط آنتی اکسیدان ها اشاره کرد (۱۶). یافته های اخیر نشان می دهند نانوذرات فولرن، آلوتروپ سوم کربن، به عنوان یک عامل جمع کننده رادیکال های آزاد در محیط های زیستی عمل می کنند (۱۷-۱۹). این نانوذرات

انواع متفاوتی دارند و معروف ترین نوع آن فولرن C₆₀ نام دارد. فولرن بدلیل ساختمان غیر قطبی حلالیت بسیار کمی در محیط های آبی دارد و با اضافه کردن عامل هیدروکسیل حلالیت آن در محیط های زیستی و آبی افزایش می یابد (۲۰)، که در این صورت فولرنول نامیده می شود (۲۱).

در یک تحقیق Zha و همکاران نشان دادند این نانوذرات با خاصیت روبشی رادیکال های آزاد در محیط کشت باعث محافظت نورون های هیپوکامپ در مقابل استرس اکسیداتیو گردیده است (۲۲). در تحقیق دیگر Dugan و همکاران نشان دادند با حضور این نانوذرات در محیط کشت سلول های عصبی ناحیه قشر مغز از اثرات مسمومیت سلولی برخی اکسیدان ها و در نهایت آپوپتوز این سلول ها جلوگیری شده است (۲۳). در تحقیق دیگر Mirkov و همکاران گزارش کردند که فولرن هیدروکسیله (فولرنول) علاوه بر توانایی حذف رادیکال های آزاد اکسیژن از محیط سلول های کشت شده با حذف رادیکال های آزاد نیتروژن نقش محافظتی در برابر مرگ سلولی دارد (۲۴). علاوه بر مطالعات ذکر شده که در شرایط برون تنی (In vitro) انجام شده برخی مطالعات در شرایط درون تنی (In vivo) نیز اثرات محافظت سلولی این نانوذرات را گزارش کرده اند. در تحقیقی استفاده از مشتقات محلول در آب نانوذرات فولرن از طریق کاهش بیان ژن های مربوط به آپوپتوز و استرس اکسیداتیو میزان زنده ماندن سلول ها در برابر تابش اشعه افزایش یافته است (۲۵). در تحقیق دیگر Srdjenovic و همکاران گزارش کردند، استفاده از فولرن هیدروکسیله، مسمومیت ناشی از برخی داروهای شیمی درمانی همچون داکسوروبیسین در برخی از بافت های بدن مثل کلیه، بیضه و ریه را کاهش می دهد (۲۶). هم چنین اثرات محافظتی این نانوذرات در مقابل اشعه ماوراء بنفش از طریق عملکرد روبشی رادیکال های آزاد اکسیژن در کراتینوسیت های پوست انسان گزارش شده است (۲۷). در نهایت، بر طبق یافته های Kim و همکاران استفاده از

هیدروکسی فولرن در مدل ایسکمی فراگیر مغز از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌ها جلوگیری می‌کند (۲۸). بر پایه این خاصیت روبشی رادیکال‌های آزاد توسط نانوذرات فولرن، هدف از بررسی مطالعه حاضر تاثیر محافظت احتمالی نانوذرات فولرنول ($C_{60}(OH)_{18-22}$) در مقابل آسیب‌های ناشی از خون‌رسانی مجدد بعد از ایسکمی موضعی و گذرای مغز در موش صحرایی بود.

مواد و روش‌ها

حیوانات و نحوه نگهداری آن‌ها

در این مطالعه تجربی از ۲۴ سر موش صحرایی بالغ نر نژاد ویستار که از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) در محدوده وزنی ۲۷۰ تا ۳۲۰ گرم خریداری شدند، استفاده گردید. حیوانات قبل از مطالعه و در طی آزمایش در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی، رطوبت مناسب، درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی گراد و با 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.

القاء ایسکمی - خون‌رسانی مجدد مغز

برای آماده سازی حیوان جهت ایجاد ایسکمی موقتی - موضعی مغز از روش ارائه شده توسط Longa و همکاران استفاده گردید (۲۹). در ابتدا موش‌های صحرایی توسط ایزوفلوران ۲/۵ درصد (انگلستان) بیهوش شدند. بعد از تثبیت حیوان روی میز جراحی، ناحیه گردن از وسط باز شد 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 شد و همزمان با بستن قسمت پائین آن نخ نایلون آماده شده (شماره ۳-۰) که نوک آن توسط

حرارت گرد شده بود و سطح آن با پلی ال-لیزین پوشانده شده بود را از راه شکاف وارد شریان داخلی و از آنجا به آرامی به داخل جمجمه و به طرف حلقه ویلیس هدایت شد تا به ابتدای شریان میانی مغز برسد. با عبور نوک نخ از ابتدای شریان میانی مغز، مقاومت اندکی در هدایت آن ایجاد می‌شد (۳۰). بعد از اطمینان از قرارگیری نخ آماده شده در محل مورد نظر 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 بهبود 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 نگه‌داشته می‌شد. بعد از هوشیاری کامل، حیوان را به قفس منتقل می‌شد و تا انجام آزمایش‌های بعدی در شرایط مناسب نگهداری می‌گردید.

پروتکل و گروه‌های آزمایشی

پروتکل و گروه‌های آزمایشی در این تحقیق به صورت زیر انجام شد و حیوانات مورد نظر به صورت تصادفی در ۳ گروه به شرح زیر قرار گرفتند:

۱- گروه شاهد (Sham, n=۸): در حیوانات این گروه بعد از بیهوشی، عمل جراحی جهت انسداد شریان میانی مغز با آشکارسازی شریان کاروتید مشترک و شریان‌های کاروتید خارجی و داخلی در ناحیه گردن انجام می‌شد ولی عمل انسداد شریان میانی مغز صورت نمی‌پذیرفت. با توجه به عدم انسداد شریان میانی مغز، ۲۴ ساعت بعد از پایان جراحی هیچ‌گونه علائم حاکی از ایسکمی مغزی مشاهده نشد.

۲- گروه ایسکمی - خون‌رسانی مجدد (IR, n=۸): در حیوانات این گروه کلیه اعمال جراحی تا مرحله القاء ایسکمی مشابه گروه شاهد بود. القاء ایسکمی به مدت ۹۰ دقیقه دوام پیدا می‌کرد و مرحله خون‌رسانی مجدد با

گرفت (۳۱). در این تست به صورت قراردادی اختلالات عصبی - حرکتی حیوان به شرح زیر از نمره ۱ تا ۵ درجه بندی شده است. نمره ۱ به حیواناتی داده می شد که هیچگونه اختلال حرکتی نشان نمی دادند (حیوانات گروه شاهد). نمره ۲ برای حیوانی در نظر گرفته می شد که دست سمت متقابل نیمکره ایسکمی شده (دست چپ) را موقع آویزان شدن از دم خم می نمود (حالت Flexion). نمره ۳ به حیوانی تعلق می گرفت که در شروع حرکت در یک سطح صاف به سمت متقابل نیمکره ایسکمی شده (سمت چپ) می چرخید و حیوانی که رفلکس ایستادن را از دست داده بود نمره ۴ و در نهایت نمره ۵ به حیواناتی داده می شد که فاقد هر گونه حرکت خودبخودی بودند.

اندازه گیری حجم ضایعه مغزی

به این منظور، حیوانات گروه شاهد ۲۴ ساعت پس از جراحی و گروه های ایسکمی (کنترل ایسکمی و ایسکمی درمان شده) ۲۴ ساعت پس از آغاز خونرسانی مجدد توسط کتامین به طور عمیق بیهوش گردیدند. جهت اندازه گیری حجم ضایعه مغزی در نیمکره ایسکمی شده مغز خارج شده از جمجمه را برای سخت شدن به مدت ۵ دقیقه در نرمال سالین ۴ درجه قرار داده می شد و سپس با استفاده از ماتریکس مغزی شش برش عرضی (Coronal) به قطر ۲ میلی متر تهیه و جهت رنگ آمیزی به مدت ۲۰ دقیقه در محلول ۲ درصد تری فنیل تترازیلیوم کلراید (TTC) گذاشته شدند. در این روش رنگ آمیزی، ناحیه ایسکمی شده مغز به رنگ سفید و نواحی سالم به رنگ قرمز آجری در می آید. برش های رنگ شده را جهت تثبیت شدن به مدت ۲۴ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد بافر شده قرار داده و بعد از آماده سازی نهایی، از هر شش برش به طور جداگانه توسط دوربین دیجیتال (Cannon, Japan) عکس گرفته شد و با استفاده از کامپیوتر و نرم افزار مخصوص (NIH image Analyzer) حجم ناحیه ضایعه دیده با

بیرون کشیدن آهسته نخ شروع شد و بعد از ۱۵ دقیقه محل جراحی بخیه زده شد و حیوان در محل مناسب نگهداری می شد. ارزیابی اختلالات عصبی - حرکتی ۲۴ ساعت بعد از شروع مرحله خونرسانی مجدد در حیواناتی که زنده می ماندند، انجام می گردید. سپس تحت بیهوشی عمیق، با تزریق داخل صفاقی تیوپنتال سدیم، حیوان را کشته، سر را جدا کرده و مغز را با احتیاط کامل از جمجمه خارج نموده و جهت بررسی متغیرهای مورد نظر آماده سازی می شدند.

۳- گروه ایسکمی - خونرسانی مجدد و درمان با فولرنول (IR+ Fullerenol, n=8): حیوانات این گروه در پایان انسداد شریان میانی مغز و بلافاصله با شروع مرحله خونرسانی مجدد فولرنول (۱۰ mg/kg) به صورت داخل صفاقی دریافت کردند و مابقی پروتکل ها و جراحی جهت فیلامان گذاری برای القاء ایسکمی - خونرسانی مجدد همانند گروه کنترل ایسکمی - خونرسانی مجدد انجام گردید.

ماده مورد استفاده برای تیمار حیوانات در این تحقیق (فولرنول) از شرکت سیگما (امریکا) خریداری شد. جهت آماده سازی فولرنول برای تزریق، ابتدا پودر خریداری شده توسط ترازوی دقیق دیجیتالی وزن شد و به صورت تازه با محلول نرمال سالین حل می شد. در نهایت محلول فولرنول تهیه شده به صورت تازه و پس از محاسبه مقدار تزریق (۱۰ mg/kg) برای هر حیوان به صورت داخل صفاقی تزریق می شد. میزان حجم تزریق بین ۰/۵ تا یک میلی لیتر بسته به وزن و محاسبات انجام شده بود که معادل آن نرمال سالین به حیوانات گروه شاهد و کنترل ایسکمی تزریق می شد.

ارزیابی اختلالات عصبی - حرکتی

در حیواناتی که تا ۲۴ ساعت بعد از پایان دوره ایسکمی زنده می ماندند اختلالات عصبی - حرکتی با بکارگیری تست پنج نمره ای توسط فردی که نسبت به گروه تیمار شده آگاهی نداشت، مورد ارزیابی قرار

روش ارائه شده در مطالعات قبلی بعد از ایسکمی مغز محاسبه گردید (۳۲).

اندازه گیری میزان ادم مغزی

جهت اندازه گیری میزان ادم مغزی حیوانات گروه شاهد ۲۴ ساعت پس از جراحی و گروه های ایسکمی (کنترل ایسکمی و ایسکمی درمان شده) ۲۴ ساعت پس از آغاز خونرسانی مجدد توسط کتامین به طور عمیق بیهوش گردیدند. جهت اندازه گیری ادم مغزی نیمکره ایسکمی شده، ابتدا پیاز بویایی و پل مغزی جدا شد و توسط ماتریکس مغزی و با دقت کامل مغز به دو نیمکره راست (ضایعه دیده) و چپ (سالم) تقسیم شد. بر اساس روش گرتیس، بطور جداگانه وزن مرطوب (WW) دو نیمکره با کمک ترازوی دقیق دیجیتالی اندازه گیری شد و سپس با قرار دادن آن‌ها در آون با درجه حرارت ۱۱۰ درجه سانتی گراد، به مدت ۲۴ ساعت، وزن خشک (DW) هر نیمکره مشخص گردیده و با استفاده از فرمول ۱ درصد آب دو نیمکره راست (%WC_{RH}) و چپ (%WC_{LH}) محاسبه شد و در نهایت درصد ادم مغزی با استفاده از فرمول شماره ۲ در گروه های ایسکمی تعیین شد (۳۳).

$$1- \%H_2O = [(WW-DW) / WW] \times 100$$

$$2- \%Edema = \%WC_{RH} - \%WC_{LH}$$

اندازه گیری شاخص استرس اکسیداتیو

در انتهای آزمایش، حیوانات تحت بیهوشی عمیق قرار گرفتند و پس از خارج ساختن به سرعت به داخل نیتروژن مایع و فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد انتقال یافت. برای تعیین محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها و میزان مالوندی آلدئید (MDA)، از روش Satho استفاده شد (۳۴). در روز آزمایش، بافت مغز منجمد شده به دقت توزین و به نسبت ۱:۱۰ در بافر فسفات سالین همورژیزه شده و پس از آن نمونه‌ها در ۱۴۰۰۰ g و ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردیدند. در ادامه، به ۵۰۰ میکرولیتر بافت همورژیزه، ۱/۵ میلی لیتر

اسید تری کلرواستیک (TCA) ۱۰ درصد اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد، سپس ۱/۵ میلی لیتر از مایع رویی را برداشته و ۲ میلی لیتر اسیدتیوباریتوریک ۰/۶۷ درصد به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری جوش قرار گرفت؛ سپس ۲ میلی لیتر ۱- بوتانل به محلول اضافه شد و بعد از ورتکس شدید، به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. جذب محلول رویی صورتی رنگ به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر (CECIL-2501, England) در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت گردید. غلظت MDA، با استفاده از ۱، ۱، ۳ و ۳ تترا اتوکسی پروپان به عنوان استاندارد، تعیین و MDA بر حسب میکروگرم بر میلی گرم پروتئین محاسبه شد. محلول استاندارد MDA در غلظت‌های ۰/۲-۲۰ میکرومولار در اسیدسولفوریک ۱۰ درصد تهیه گردید. برای تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد (۳۵). حجم معینی از عصاره بافتی با رقت مناسب را برداشته شد و به حجم ۱ میلی لیتر رسانده شد. سپس ۲ میلی لیتر از محلول برادفورد با رقت ۱:۳ به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس در طول موج ۵۹۵ نانومتر، میزان جذب قرائت شد. جهت رسم منحنی استاندارد، ابتدا محلول ۱ میلی گرم بر میلی لیتر از آلبومین سرم گاوی (BSA) تهیه گردید. سپس غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکروگرم در میلی لیتر از آن ساخته و به عنوان غلظت‌های استاندارد به کار برده شد.

روش آنالیز آماری

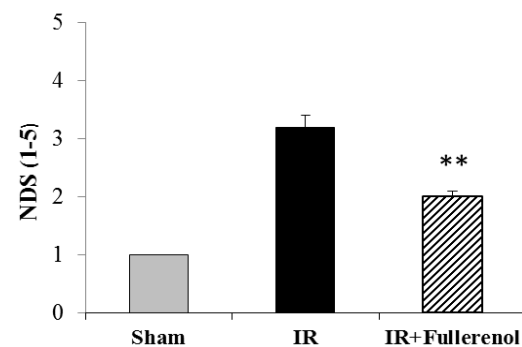
نتایج بدست آمده به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین (Mean \pm SEM) ارائه شده است. برای مقایسه داده‌های بدست آمده بین گروه‌های مختلف از روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و از تست تعقیبی Tukey استفاده گردید. همچنین برای مقایسه داده‌های اختلافات عصبی-حرکتی از روش مقایسه‌ای غیر پارامتریک (Nonparametric) و تست آماری Mann-Whitney U

استفاده شد. در تمامی مقایسه‌ها $p < 0/05$ به عنوان اختلاف معنی دار تلقی گردید.

یافته ها

نتایج اختلالات عصبی-حرکتی

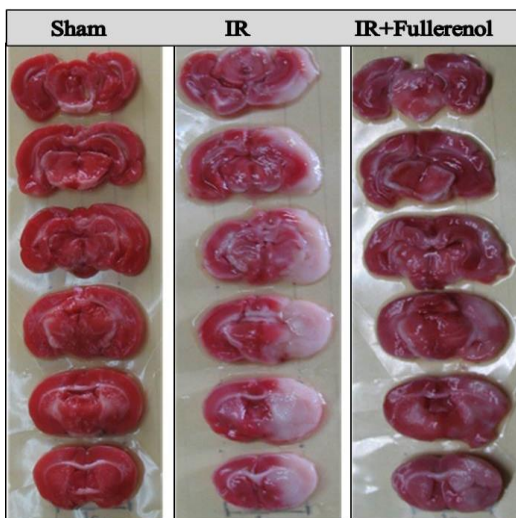
نتایج حاصل از بررسی اختلالات عصبی-حرکتی در گروه‌های آزمایشی در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است. در گروه شاهد هیچگونه اختلالات عصبی-حرکتی مشاهده نشد و میزان این متغیر در گروه شاهد برابر با یک بود. مقادیر عددی این پارامتر برای گروه کنترل ایسکمی $3/20 \pm 0/20$ از ۵ بود که نشان می‌داد القای ایسکمی خونرسانی مجدد مغزی توانسته به مقدار زیادی اختلالات عصبی-حرکتی در حیوانات این گروه ایجاد نماید. استفاده از نانوذره فولرنول بلافاصله در ابتدای خونرسانی مجدد در گروه ایسکمی-خونرسانی مجدد درمان شده میزان اختلالات عصبی-حرکتی را به مقدار قابل ملاحظه‌ای کاهش داد ($2/1 \pm 0/1$). این کاهش در مقایسه با گروه ایسکمی-خونرسانی مجدد درمان نشده از نظر آماری معنی داری بود ($p < 0/01$).



تصویر شماره ۱: اختلالات عصبی-حرکتی ۲۴ ساعت بعد از شروع خونرسانی مجدد در گروه‌های مورد آزمایش: گروه شاهد (Sham)، گروه ایسکمی-خونرسانی مجدد (IR) و گروه ایسکمی-خونرسانی مجدد درمان شده با فولرنول (IR+Fullerenol) داده‌ها به صورت $mean \pm SEM$ نشان داده شده است. ** نشانگر تفاوت معنی دار با $p < 0/01$ در مقایسه با گروه ایسکمی-خونرسانی مجدد (IR)

نتایج حجم ضایعه مغزی

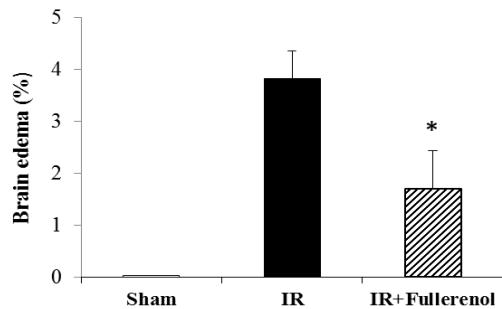
تصویر شماره ۲ مقاطع تهیه شده از بافت مغز با رنگ آمیزی TTC در گروه‌های شاهد، ایسکمی-خونرسانی مجدد و گروه ایسکمی-خونرسانی مجدد درمان شده با فولرنول را نشان می‌دهد. یکنواختی رنگ قرمز آجری تاییدی بر عدم وجود ضایعه بافتی در نیمکره راست و چپ گروه شاهد و نیمکره چپ گروه‌های ایسکمی-خونرسانی مجدد درمان شده و نشده می‌باشد. القاء ایسکمی-خونرسانی مجدد توانسته ضایعه نسبتاً وسیعی در نواحی قشر و زیر قشر نیمکره ایسکمی شده ایجاد نماید (نواحی سفید رنگ). در حالی که میزان ضایعه ایجاد شده توسط فولرنول در این نواحی در گروه ایسکمی-خونرسانی مجدد درمان شده در مقایسه با گروه ایسکمی-خونرسانی مجدد درمان نشده به مقدار قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت.



تصویر شماره ۲: تصاویر تهیه شده از مقاطع کرونال بافت مغز و رنگ آمیزی به روش TTC در پایان ۲۴ ساعت خونرسانی مجدد در گروه‌های مورد آزمایش: گروه شاهد (Sham)، گروه ایسکمی-خونرسانی مجدد (IR) و گروه ایسکمی-خونرسانی مجدد درمان شده با فولرنول (IR+Fullerenol). مناطق سفیدرنگ نشان دهنده ناحیه ایسکمی و مناطق قرمز نشان دهنده نواحی سالم مغز است.

تصویر شماره ۳ مقادیر کمی حجم ضایعه مغزی بر حسب میلی متر مکعب (mm^3) در نیمکره ایسکمی (راست)

درصد ادم نیمکره ایسکمی شده مغز را در گروه ایسکمی - خونرسانی مجدد درمان شده به طور معنی داری کاهش داد ($p < 0.05$)، که میزان آن 1.70 ± 0.74 درصد بود.

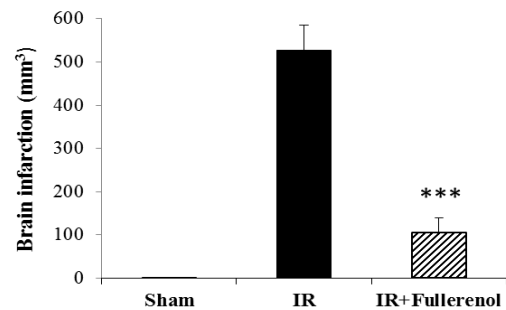


تصویر شماره ۴: مقادیر درصد ادم مغزی نیمکره راست ۲۴ ساعت بعد از شروع خونرسانی مجدد در گروه های مورد آزمایش: گروه شاهد (Sham)، گروه ایسکمی - خونرسانی مجدد (IR) و گروه ایسکمی - خونرسانی مجدد درمان شده با فولرنول (IR+Fullerenol). داده ها به صورت $mean \pm SEM$ نشان داده شده است. ** نشانگر تفاوت معنی دار با $p < 0.05$ در مقایسه با گروه ایسکمی - خونرسانی مجدد (IR)

نتایج غلظت مالون دی آلدئید (MDA)

تصویر شماره ۵ نتایج به دست آمده از غلظت مالون دی آلدئید نیمکره ایسکمی مغز بر حسب میکروگرم بر میلی گرم پروتئین ($\mu\text{g}/\text{mg protein}$) که شاخص تولید رادیکال های آزاد اکسیژن می باشد را در گروه های آزمایشی نشان می دهد. میانگین غلظت مالون دی آلدئید نیمکره راست حیوانات گروه شاهد $0.74 \pm 0.34 \mu\text{g}/\text{mg protein}$ بود. مقادیر عددی این متغیر در گروه کنترل ایسکمی - خونرسانی مجدد افزایش معنی داری نسبت به گروه شاهد داشت ($p < 0.001$)، و میزان آن برابر با $5.30 \pm 0.11 \mu\text{g}/\text{mg protein}$ بود. دریافت فولرنول در آغاز مرحله خونرسانی مجدد مقادیر غلظت مالون دی آلدئید نیمکره ایسکمی مغز را در گروه ایسکمی - خونرسانی مجدد درمان شده به طور معنی داری کاهش داد ($p < 0.001$)، که میزان آن $0.78 \pm 0.16 \mu\text{g}/\text{mg protein}$ بود.

گروه های شاهد، ایسکمی - خونرسانی مجدد و ایسکمی - خونرسانی مجدد درمان شده با فولرنول را نشان داده است. مجموع ضایعه کل نیمکره ایسکمی شده در حیوانات گروه ایسکمی - خونرسانی مجدد $527 \pm 59 \text{ mm}^3$ بود. دریافت فولرنول به میزان $10 \text{ mg}/\text{kg}$ بلافاصله در آغاز مرحله خونرسانی مجدد مقادیر حجم ضایعه کل را در گروه ایسکمی - خونرسانی مجدد درمان شده به طور معنی داری کاهش داد ($p < 0.001$)، که میزان آن $106 \pm 33 \text{ mm}^3$ بود.



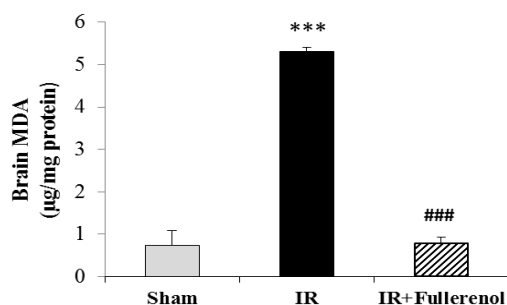
تصویر شماره ۳: میزان حجم ضایعه نیمکره ایسکمی شده بر حسب میلی متر مکعب (mm^3) ۲۴ ساعت بعد از شروع خونرسانی مجدد در گروه های مورد آزمایش: گروه شاهد (Sham)، گروه ایسکمی - خونرسانی مجدد (IR) و گروه ایسکمی - خونرسانی مجدد درمان شده با فولرنول (IR+Fullerenol). داده ها به صورت $mean \pm SEM$ نشان داده شده است. *** نشانگر تفاوت معنی دار با $p < 0.001$ در مقایسه با گروه ایسکمی - خونرسانی مجدد (IR)

نتایج درصد ادم مغزی

مقادیر تشکیل ادم مغزی (درصد) نیمکره های راست مغز در تصویر شماره ۳ برای گروه های شاهد، ایسکمی - خونرسانی مجدد و ایسکمی - خونرسانی مجدد درمان شده با فولرنول نشان داده شده است. درصد تشکیل ادم مغزی در گروه شاهد در حد صفر بود. در حالیکه در گروه ایسکمی - خونرسانی مجدد این میزان افزایش قابل ملاحظه ای یافت و میزان آن 3.83 ± 0.53 درصد بود. دریافت فولرنول به میزان $10 \text{ mg}/\text{kg}$ بلافاصله در آغاز مرحله خونرسانی مجدد میانگین

مقدار بسیار زیادی افزایش یافته بود (افزایش MDA) را به مقدار زیادی کاهش داد. در نهایت اختلالات عصبی - حرکتی حیوانات دچار ایسکمی - خونرسانی مجدد درمان شده به مقدار زیادی در مقایسه با حیوانات درمان نشده بهبود یافت.

اولین استراتژی های درمان در سکنه مغزی، برداشتن انسداد مغز ناشی از تشکیل لخته است. بعد از رفع انسداد، برقراری مجدد جریان خون در ناحیه ایسکمی شده گرچه با رساندن مواد متابولیکی سلول ها و برداشت مواد زائد به نظر می رسد شدت آسیب های ایسکمی را کاهش دهد اما مسیرها و سیگنال های مخرب سلولی گسترده ای در این ناحیه فعال شده منجر به ایجاد آسیب های خونرسانی مجدد می گردد (۴۰،۵). در تحقیق حاضر القاء ایسکمی - خونرسانی مجدد توانست به میزان گسترده ای تولید رادیکال های آزاد اکسیژن را به همراه ضایعه وسیع در نیمکره ایسکمی شده ایجاد نماید. موازی با این تغییرات به میزان گسترده ای اختلالات عصبی - حرکتی در این حیوانات ظاهر شد. یکی از مسیرهای مخرب که نقش کلیدی در آسیب های خونرسانی مجدد بعد از بروز ایسکمی دارد، تولید انواع رادیکال های آزاد اکسیژن می باشد (۴۱). افزایش تولید انواع رادیکال های آزاد به دلایل مختلفی در نیمکره ایسکمی شده به وجود می آید. نتایج تحقیقات نشان می دهد بعد از ایسکمی مغز سیستم دفاع آنتی اکسیدانی مغز تضعیف شده و حذف رادیکال های آزاد اکسیژن تولید شده مخصوصاً در مرحله خونرسانی مجدد دچار نقص می گردد (۴۲،۴۱). از مهم ترین آنزیم ها که در طول ایسکمی - خونرسانی مجدد مغز دچار کاهش مقدار و فعالیت می شوند آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و کاتالاز هستند (۴۴-۴۲). همچنین مشخص شده میزان و فعالیت آنزیم های تولید کننده انواع رادیکال های آزاد بعد از بروز ایسکمی افزایش می یابد. از بین این آنزیم ها NADPH-اکسیداز و گزانتین اکسیداز بسیار مهم هستند (۴۶،۴۵). افزایش میزان



تصویر شماره ۵: مقدار مالون دی آلدئید (MDA) مغز بر حسب میکروگرم بر میلی گرم پروتئین (µg/mg protein) ۲۴ ساعت بعد از شروع خونرسانی مجدد در گروه های مورد آزمایش: گروه شاهد (Sham)، گروه ایسکمی - خونرسانی مجدد (IR) و گروه ایسکمی - خونرسانی مجدد درمان شده با فولرنول (IR+Fullerenol). داده ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ نشان داده شده است. *** نشانگر تفاوت معنی دار با $p < 0.001$ در مقایسه با گروه شاهد (Sham) ### نشانگر تفاوت معنی دار با $p < 0.001$ در مقایسه با گروه ایسکمی - خونرسانی مجدد (IR)

بحث

نقش رادیکال های آزاد اکسیژن در پاتوفیزیولوژی و تشدید آسیب های ناشی از ایسکمی مغز به ویژه در مرحله خونرسانی مجدد به اثبات رسیده است (۳۸-۳۶). نتایج مطالعات حاکی از آن است که برخی از نانوذرات کربن خاصیت آنتی اکسیدانی دارند و در این میان برخی مشتقات محلول در آب نانوذرات فولرن توجه محققین زیادی را در جلوگیری از آسیب های مختلف بدن در شرایط پاتولوژیک که رادیکال های آزاد اکسیژن در پاتوفیزیولوژی آن ها نقش دارند، را به خود جلب کرده است (۳۹،۲۰). در تحقیق حاضر استفاده از نانوذرات فولرن هیدروکسیله (فولرنول) که دارای خاصیت محلول در آب نیز است در آغاز مرحله خونرسانی مجدد (بلافاصله بعد از پایان ایسکمی) توانست آسیب های ناشی از ایسکمی - خونرسانی مجدد مغز منجمله حجم ضایعه و ادم مغزی را به مقدار قابل ملاحظه ای کاهش دهد. همچنین استفاده از این نانوذره میزان رادیکال های آزاد اکسیژن که بعد از القاء ایسکمی - خونرسانی مجدد به

رادیکال‌های آزاد در تحقیق حاضر که افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید نیمکره ایسکمی شده هم‌گویای همین مطلب می‌باشد به شیوه‌های متعدد سبب تشدید ضایعه مغزی می‌گردد. اتصال این رادیکال‌ها بخصوص رادیکال‌های هیدروکسیل به اسیدهای نوکلئیک از طریق صدمه به ساختار و قطعه قطعه کردن این ماکرومولکول فرآیند مرگ سلولی را فعال می‌کند (۴۷). از طرفی اتصال این رادیکال‌ها به ساختمان اصلی پروتئین‌ها و یا شاخه‌های جانبی آن‌ها موجب قطعه قطعه شدن و تخریب ساختمان پروتئین‌ها می‌شود و در مواردی باعث فعال شدن پروتئازهای داخل سلولی می‌گردد (۴۸). به‌علاوه چربی‌های بافت مغز به دلیل دارا بودن اسیدهای چرب غیر اشباع فراوان و همچنین مصرف اکسیژن بالا توسط بافت مغز و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پایین در مقایسه با سایر بافت‌های بدن به آسانی تحت پراکسیداسیون قرار می‌گیرند (۴۹، ۵۰). در نهایت ترکیب این رادیکال‌ها با رادیکال‌های آزاد نیتروژن (نیتریک اکساید) باعث ایجاد ترکیب بسیار خطرناکی در ناحیه ایسکمی به نام پراکسی نیتريت می‌شود که مهم‌ترین عامل نكروز بافتی و تحريك مرگ برنامه ریزی شده سلولی است (۵۱). یافته‌های تحقیق حاضر نشان می‌دهد استفاده از نانوذرات فولرنول در ابتدای مرحله خون‌رسانی مجدد توانسته میزان حجم ضایعه مغز را به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش دهد و باعث بهبود اختلالات عصبی - حرکتی گردد. موازی با کاهش این آسیب‌ها استفاده از فولرنول در این مرحله توانست میزان مالون‌دی‌آلدئید بافت مغز به عنوان شاخص اصلی برای افزایش تولید رادیکال‌های آزاد را به مقدار زیادی کاهش دهد. مطالعات انجام شده اخیر خاصیت روبشی انواع رادیکال‌های آزاد توسط این نانوذره را به خوبی در شرایط برون تنی و در شرایط درون تنی به اثبات رسانده‌اند (۲۰، ۳۹). به‌طوری که محققین به دلیل خاصیت روبشی نانوذرات فولرنول در جمع‌آوری انواع رادیکال‌های آزاد اصطلاحاً از آن به عنوان "اسفنج رادیکال‌ها" یاد

کرده‌اند (۵۲). گزارش شده نانوذرات فولرنول قادر است از طریق نفوذ در لایه لیپیدی غشاء بخصوص غشای میتوکندری از اثرات مخرب اکسیدان‌ها جلوگیری کرده و از پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و قطعه قطعه شدن پروتئین‌ها جلوگیری نماید (۱۷). هم‌چنین بررسی انجام شده روی نورون‌های CA1 هیپوکامپ بعد از ایجاد ایسکمی گلوبال نشان می‌دهد، استفاده از فولرنول هیدروکسیله از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدها، سبب محافظت نورون‌ها می‌گردد (۲۰). در نهایت، گزارش شده، فولرنول هیدروکسیله از اختلال عملکرد میتوکندری در اثر رادیکال‌های آزاد در مدل ایجاد شده پارکینسون جلوگیری می‌کند (۵۳). همان‌طور که در پاراگراف قبلی به خوبی در ارتباط با نقش کلیدی افزایش رادیکال‌های آزاد در ارتباط با آسیب‌های ناشی از ایسکمی - خون‌رسانی مجدد که به طور مفصل بحث گردید و از طرفی دیگر خاصیت روبشی و حذف رادیکال‌های آزاد توسط این ترکیب در مطالعات ذکر شده ارائه شد می‌توان نتیجه‌گیری کرد در تحقیق حاضر نیز استفاده از این ترکیب با خاصیت روبشی قوی خود توانسته رادیکال‌های آزاد تولید شده را در مناطق ایسکمی حذف کرده (کاهش میزان مالون‌دی‌آلدئید نیمکره ایسکمی شده) و با حذف اثرات سمی این رادیکال‌ها باعث کاهش حجم ضایعه و بهبود اختلالات عصبی - حرکتی شود.

ادم مغزی یکی از مهم‌ترین عوارض سکنه مغزی بوده و بررسی‌های اخیر نشان می‌دهد ادم مغز سبب افزایش میزان درصد مرگ و میر بیماران سکنه مغزی می‌شود (۳۷). در تحقیق حاضر نیز در پایان ۲۴ ساعت خون‌رسانی مجدد ادم گسترده‌ای در بافت مغز مشاهده گردید. مطالعات انجام شده نشان می‌دهند رادیکال‌های آزاد نقش مهم و کلیدی در بروز ادم مغز بعد از سکنه مغزی دارند (۳۷، ۵۴). گزارش شده تولید رادیکال‌های آزاد در مرحله خون‌رسانی مجدد منجر به انقباض پریسایت‌های موجود در دیواره مویرگ‌های مغزی می‌شود که از

کرده و از تشکیل ادم ناشی از ایسکمی کاسته است. بر اساس یافته‌های تحقیق حاضر نانوذرات فولرنول به طور قابل ملاحظه‌ای آسیب‌های ناشی از خونرسانی مجدد (حجم ضایعه و ادم مغز) به دنبال ایسکمی مغز را کاهش داده و باعث کاهش اختلالات عصبی- حرکتی ناشی از سکنه مغزی می‌گردد. به نظر می‌رسد ماهیت رویشی رادیکال‌های آزاد توسط این نانوذرات در کاهش آسیب‌های ناشی از ایسکمی مغز عامل اصلی اثرات مفید این ترکیب باشد. بر اساس نتایج این تحقیق می‌توان نتیجه‌گیری کرد فولرنول می‌تواند به‌عنوان یک عامل مؤثر در پیشگیری یا کاهش عوارض سکنه مغزی به‌خصوص در مرحله خونرسانی مجدد مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل نتایج پایان نامه دکتری می‌باشد. بدین وسیله از گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله که مقدمات و وسائل مورد نیاز 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.

بازجذب آب به‌داخل عروق ممانعت کرده و در نهایت موجب تجمع آب و ادم در بافت ایسکمی شده مغز گردیده است (۵۵). هم‌چنین به خوبی مشخص شده رادیکال‌های آزاد باعث تخریب عروق مغزی از طریق آسیب به اتصالات محکم بین سلول‌های اندوتلیال می‌شود که منجر به شکسته شدن سد خونی- مغزی شده و از طریق ایجاد فشار اسمزی- کلوئیدی سبب ادم مغز بعد از ایسکمی می‌گردد (۵۶). به نظر می‌رسد در تحقیق حاضر هم افزایش رادیکال‌های آزاد که سبب تشکیل ادم در مرحله خونرسانی مجدد شده است. از طرفی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از نانوذرات فولرنول سبب کاهش ادم در مرحله خونرسانی مجدد شده است. از آنجایی که مطالعات انجام شده اخیر خاصیت رویشی انواع رادیکال‌های آزاد توسط این نانوذره را به خوبی در شرایط برون تنی و در شرایط درون تنی به اثبات رسانده‌اند (۳۹،۲۰) هم‌چنین نقش این رادیکال‌ها در تشکیل ادم مغزی در مرحله خونرسانی مجدد به خوبی مشخص نموده‌اند (۵۶)، بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که در تحقیق حاضر نیز احتمالاً استفاده از این نانوذرات از طریق کاهش تجمع رادیکال‌های آزاد در منطقه ایسکمی از آسیب به عروق مغزی جلوگیری

References

1. Thorvaldsen P, Asplund K, Kuulasmaa K, Rajakangas A-M, Schroll M. Stroke incidence, case fatality, and mortality in the WHO MONICA project. *Stroke* 1995; 26(3): 361-367.
2. Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med* 2009; 7(97): 1-11.
3. Balami JS, Chen RL, Grunwald IQ, Buchan AM. Neurological complications of acute ischemic stroke. *Lancet Neurol* 2011; 10(4): 357-371.
4. Allen CL, Bayraktutan U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischemic stroke. *Int J Stroke* 2009; 4(6): 461-470.
5. Deb P, Sharma S, Hassan K. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: an overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. *Pathophysiology* 2010; 17(3): 197-218.
6. 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.
7. 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): 404-414.
 8. Radi R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *J Biol Chem* 2013; 288(37): 26464-26472.
 9. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite :implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(4): 1620-1624.
 10. Shirley R, Ord EN, Work LM. Oxidative stress and the use of antioxidants in stroke. *Antioxidants* 2014; 3(3): 472-501.
 11. Mohammadi M, Dehghani GA. Acute hypertension induces brain injury and blood-brain barrier disruption through reduction of claudins mRNA expression in rat. *Pathol Res Pract* 2014; 210(12): 985-990.
 12. Zador Z, Stiver S, Wang V, Manley GT. Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. *Handb Exp Pharmacol* 2009; 190: 159-170.
 13. Raghupathi R, Grahamdi, McIntosh TK. Apoptosis after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2000; 17(10): 927-938.
 14. Cherubini A, Polidori MC, Bregnocchi M, Pezzuto S, Cecchetti R, Ingegneri T, et al. Antioxidant profile and early outcome in stroke patients. *Stroke* 2000; 31(10): 2295-2300.
 15. Alluri H, Stagg HW, Wilson RL, Clayton RP, Sawant DA, Koneru M, et al. Reactive oxygen species-caspase-3 relationship in mediating blood-brain barrier endothelial cell hyperpermeability following oxygen-glucose deprivation and reoxygenation. *Microcirculation* 2014; 21(2): 187-195.
 16. Margail I, Plotkine M, Lerouet D. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radic Biol Med* 2005; 39(4): 429-443.
 17. Chistyakov V, Smirnova YO, Prazdnova E, Soldatov A. Possible mechanisms of fullerene C₆₀ antioxidant action. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 1-4.
 18. Markovic Z, Trajkovic V. Biomedical potential of the reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C₆₀). *Biomaterials* 2008; 29(26): 3561-3573.
 19. Rade I, Biljana G, Aleksandar D, Borut S. Bioapplication and activity of fullereneol C₆₀(OH). *Afr J Biotechnol* 2008; 7(25): 4049-4050.
 20. 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): 218-223.
 21. Lens M, Medenica L, Citernesi U. Antioxidative capacity of C₆₀ (buckminsterfullerene) and newly synthesized fulleropyrrolidine derivatives encapsulated in liposomes. *Biotechnol Appl Biochem* 2008; 51(pt3): 135-140.
 22. Zha Y-y, Yang B, Tang M-l, Guo Q-c, Chen J-t, Wen L-p, et al. Concentration-dependent effects of fullereneol on cultured hippocampal neuron viability. *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 3099-3109.
 23. Dugan LL, Gabrielsen JK, Yu SP, Lin TS, Choi DW. Buckminsterfullereneol free radical scavengers reduce excitotoxic and apoptotic death of cultured cortical neurons. *Neurobiol Dis* 1996; 3(2): 129-135.

24. 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): 201-207.
25. Stankov K, Borisev I, Kojic V, Rutonjski L, Bogdanovic G, Djordjevic A. Modification of antioxidative and antiapoptotic genes expression in irradiated K562 cells upon fullereneol C₆₀(OH)₂₄ nanoparticle treatment. *J Nanosci Nanotechnol* 2013; 13(1): 105-113.
26. Srdjenovic B, Milic-Torres V, Grujic N, Stankov K, Djordjevic A, Vasovic V. Antioxidant properties of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ in rat kidneys, testes, and lungs treated with doxorubicin. *Toxicol Mech Methods*.2010; 20(6): 298-305.
27. Xiao L, Takada H, Maeda K, Haramoto M, Miwa N. Antioxidant effects of water-soluble fullerene derivatives against ultraviolet ray or peroxy lipid through their action of scavenging the reactive oxygen species in human skin keratinocytes. *Biomed Pharmacother* 2005; 59(7): 351-358.
28. Kim YO, Kim HJ, Kim SK, Yoon BCh. Neuroprotective effects of hydroxyfullerene in rats subjected to global cerebral ischemia. *Mol Cell Toxicol* 2008; 4(3): 218-223.
29. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; 20(1): 84-91.
30. Mohammadi MT, Shid-Moosavi SM, Dehghani GA. Contribution of nitric oxide synthase (NOS) activity in blood-brain barrier disruption and edema after acute ischemia/reperfusion in aortic coarctation-induced hypertensive rats. *Iran Biomed J* 2011; 15(1-2): 22-30.
31. Mohammadi MT, Shid-Moosavi SM, Dehghani GA. Contribution of nitric oxide synthase (NOS) in blood-brain barrier disruption during acute focal cerebral ischemia in normal rat. *Pathophysiology* 2012; 19(1): 13-20.
32. 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): 43-49.
33. Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Muller C, Kluge A, Kaps M, et al. Middle cerebral artery occlusion during MR-imaging: investigation of the hyperacute phase of stroke using a new in-bore occlusion model in rats. *Brain Res Brain Res Protoc* 2004; 12(3): 137-143.
34. Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta* 1978; 90(1): 37-43.
35. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
36. Gürsoy-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(8): 1974-1981.
37. Heo JH, Han SW, Lee SK. Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free Radic Biol Med* 2005; 39(1): 51-70.
38. Kuroda S, Siesjö B. Reperfusion damage following focal ischemia: pathophysiology and therapeutic windows. *Clin Neurosci* 1996; 4(4): 199-212.

39. Grebowski J, Kazmierska P, Krokosz A. Fullerenols as a new therapeutic approach in nanomedicine. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 1-9.
40. Posada-Duque RA, Barreto GE, Cardona-Gomez GP. Protection after stroke: cellular effectors of neurovascular unit integrity. *Front Cell Neurosci* 2014; 8: 1-19.
41. 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): 1884-1890.
42. Deng XL, Qian ZY, Liu NF, Ma XY, Wang HF, Hou ZJ. Antagonistic effect of 3,6-dimethylamidodibenzopyridonium gluconate on lipid peroxidation in cerebral cortical neuronal cultures and rat brains during focal cerebral ischemia reperfusion. *Acta Pharmacol Sin* 2000; 21(5): 460-462.
43. 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): 1759-1767.
44. 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): 185-192.
45. Kahles T, Luedike P, Endres M, Galla H-J, Steinmetz H, Busse R, et al. NADPH oxidase plays a central role in blood-brain barrier damage in experimental stroke. *Stroke* 2007; 38(11): 3000-3006.
46. Pacher P, Nivorozhkin A, Szabó C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev* 2006; 58(1): 87-114.
47. Cui J, Holmes EH, Greene TG, Liu PK. Oxidative DNA damage precedes DNA fragmentation after experimental stroke in rat brain. *FASEB J* 2000; 14(7): 955-967.
48. Giulivi C, Davies K. Dityrosine and tyrosine oxidation products are endogenous markers for the selective proteolysis of oxidatively modified red blood cell hemoglobin by the 19 S proteasome. *J Biol Chem* 1993; 268(12): 8752-8759.
49. 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): 152-157.
50. 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.
51. 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.
52. Xiao L, Takada H, Hui Gan X, Miwa N. The water-soluble fullerene derivative "Radical Sponge" exerts cytoprotective action against UVA irradiation but not visible-light-catalyzed cytotoxicity in human skin keratinocytes. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; 16(6): 1590-1595.
53. Cai X, Jia H, Liu Z, Hou B, Luo C, Feng Z, et al. Polyhydroxylated fullerene derivative C60 (OH) 24 prevents mitochondrial dysfunction and oxidative damage in an MPP⁺induced cellular model of Parkinson's

- disease. *J Neurosci Res* 2008; 86(16): 3622-3634.
54. Liu D, Zhang X, Hu B, Ander BP. Src Family Kinases in Brain Edema After Acute Brain Injury. *Acta Neurochir Suppl* 2016; 121: 185-190.
55. Yemisci M, Gursoy-Ozdemir Y, Vural A, Can A, Topalkara K, Dalkara T. Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nat Med* 2009; 15(9): 1031-1037.
56. Rosenberg GA, Yang Y. Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. *Neurosurg Focus* 2007; 22(5): 1-9.