ORIGINAL ARTICLE

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

Shamsi Darabi[1], Mohammad Taghi Mohammadi[2], Ali Noroozzadeh[1]

[1] Assistant Profossor, Department of Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Associate Profossor, 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±59 mm^3), and brain edema (3.83±0.53%) in control ischemic group. The content of MDA increased in ischemic brain (5.30±0.11µg/mg protein) compared with that in non-ischemic brain (0.74±0.34µg/mg protein). Administration of fullerenol in ischemic treated rats significantly reduced neurological dysfunction (2.01±0.22), brain infarction (106±33 mm^3) and brain edema (1.70±0.74%). Also, fullerenol decreased the MDA content of ischemic treatment group (0.78±0.16µg/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).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-07]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۴۴ دی سال ۱۳۹۵ (۲۶۴-۲۵۰)

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

شمسی دارابی[1] محمدتقی محمدی[2] علی نوروززاده[1]

چکیده

سابقه و هدف: تولید گسترده رادیکال‌های 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 فولرن به اثبات رسیده است، هدف از تحقیق حاضر بررسی تاثیرات نانوذرات فولرنول بر ضایعه و ادم مغزی بویژه آسیب‌های اکسیداتیو طی خونرسانی مجدد در مدل تجربی سکته بود.

مواد و روش‌ها: آزمایش توسط سه گروه از موش‌های 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. موش‌های صحرایی فولرنول ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم به‌صورت داخل‌صفاقی بلافاصله بعد از پایان MCAO دریافت کردند. شاخص اختلالات عصبی ,حجم ضایعه مغز ، ادم مغزی و مقدار مالون‌دی‌آلدئید (Malondialdehyde MDA) مغز ۲۴ ساعت پس از پایان MCAO بررسی شدند.

یافته‌ها: القاء MCAO سبب ایجاد اختلالات عصبی (۳/۲۰±۰/۲۰) و ضایعه مغزی ($۵۲۷\pm۵۹mm^3$) در گروه کنترل ایسکمی به‌همراه 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 موش‌های ایسکمی‌درمان، اختلالات عصبی (۲/۰۱±۰/۲۲)، ضایعه ($۱۰۶\pm۳۳mm^3$) و ادم مغزی (۱/۷۰±۰/۷۴%) را به‌طور معنی‌داری 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: یافته‌های ما نشان می‌دهد نانوذرات فولرنول، به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی، به‌طور مؤثری آسیب‌های مغزی ناشی از خون‌رسانی مجدد و ادم مغز را احتمالاً از طریق ماهیت روبشی رادیکال‌های آزاد کاهش می‌دهد.

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

مقدمه

سکته مغزی از مهم‌ترین اختلالات عروقی مغز است که پس از سرطان و بیماری‌های قلبی سومین عامل مرگ و میر در کشورهای صنعتی محسوب می گردد(۲،۱). افراد پس از بروز سکته مغزی در صورت زنده ماندن به دلایل ایجاد ناتوانی‌های متعدد از جمله فلج شدن قسمتی از بدن، اختلال در حافظه و صحبت کردن دچار مشکلات فراوان برای ادامه زندگی خود می‌شوند و هزینه‌های زیادی را به خانواده و جامعه تحمیل می‌نمایند(۳). بیش‌تر سکته‌های

مولف 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-07]

مغزی از نوع ایسکمی بوده (۸۰ تا ۸۵ درصد) و بقیه موارد از نوع خونریزی شونده (هموراژیک) هستند(۴). سکته 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 شریان‌های اصلی تغذیه‌ای مغز بوجود آمده و مانع رساندن اکسیژن و مواد متابولیکی مورد نیاز و همچنین برداشت مواد زائد از بافت مغز می‌گردد(۵). تولید انواع رادیکال‌های آزاد نقش بسیار کلیدی در آسیب‌های مرحله خونرسانی مجدد دارد(۷،۶). از بین این رادیکال‌ها می‌توان به گونه‌های آزاد اکسیژن (Reactive oxygen species :ROS) و رادیکال‌های آزاد نیتروژن (نیتریک اکساید) اشاره نمود که موجب صدمه به ماکرومولکول‌های حیاتی سلول نظیر پروتئین‌ها، لیپیدهای غشاء و اسیدهای نوکلئیک می‌شوند(۹،۸). افزایش این رادیکال‌ها در مرحله خونرسانی مجدد سبب افزایش نفوذپذیری غشاء میتوکندری می‌شود که از یک طرف سبب نارسایی در تولید انرژی سلول‌ها می‌شود و از طرفی دیگر باعث آزاد سازی فاکتورهای مرگ سلولی (آپوپتوز) همچون سیتوکروم c شده که باعث آغاز مرگ نورون‌ها خواهد شد(۱۰،۵). همچنین این رادیکال‌ها از طریق تغییر در بیان برخی از پروتئین‌های اختصاصی سیستم سد خونی‌مغزی منجر به ادم مغزی می‌شود که در نهایت منجر به تشدید ضایعه ناشی از سکته مغزی می‌گردد(۱۳-۱۱).

مطالعات قبلی نشان می‌دهند کاهش میزان رادیکال‌های آزاد با کاهش میزان ضایعه ناشی از سکته مغزی همراه است(۱۵،۱۴). به این منظور روش‌های متعددی برای کاهش این رادیکال‌ها پیشنهاد شده که می‌توان به مهار تولید، برداشت و جمع‌آوری آن‌ها از محیط سلول‌ها و در نهایت تخریب و حذف این رادیکال‌ها توسط آنتی‌اکسیدان‌ها اشاره کرد(۱۶). یافته‌های اخیر نشان می‌دهند نانوذرات فولرن، آلوتروپ سوم کربن، به عنوان یک عامل جمع کننده رادیکال‌های آزاد در محیط‌های زیستی عمل می‌کنند(۱۹-۱۷). این نانوذرات انواع متفاوتی دارند و معروف‌ترین نوع آن فولرن C_{60} نام دارد. فولرن بدلیل ساختمان غیر قطبی حلالیت بسیار کمی در محیط‌های آبی دارد و با اضافه کردن عامل هیدروکسیل حلالیت آن در محیط‌های زیستی و آبی افزایش می‌یابد(۲۰)، که در این صورت فولرنول نامیده می‌شود(۲۱).

در یک تحقیق Zha و همکاران نشان دادند این نانوذرات با خاصیت روبشی رادیکال‌های آزاد در محیط کشت باعث محافظت نورون‌های هیپوکامپ در مقابل استرس اکسیداتیو گردیده است(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 شده است(۲۳). در تحقیق دیگر Mirkov و همکاران گزارش کردندکه فولرن هیدروکسیله (فولرنول) علاوه بر توانایی حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن از محیط سلول‌های کشت شده با حذف رادیکال‌های آزاد نیتروژن نقش محافظتی در برابر مرگ سلولی دارد(۲۴). علاوه بر مطالعات ذکر شده که در شرایط برون‌تنی (In vitro) انجام شده برخی مطالعات در شرایط درون‌تنی (In vivo) نیز اثرات محافظت سلولی این نانوذرات را گزارش کرده‌اند. در تحقیقی استفاده از مشتقات محلول در آب نانوذرات فولرن از طریق کاهش بیان ژن‌های مربوط به آپوپتوز و استرس اکسیداتیو میزان زنده ماندن سلول‌ها 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 بافت‌های بدن مثل کلیه، بیضه و ریه را کاهش می دهد(۲۶). هم‌چنین اثرات محافظتی این نانوذرات در مقابل اشعه ماوراء بنفش از طریق عملکرد روبشی رادیکال‌های آزاد اکسیژن در کراتینوسیت‌های پوست انسان گزارش شده است(۲۷). در نهایت، بر طبق یافته‌های Kim و همکاران استفاده از

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-07]

هیدروکسی فولرن در مدل ایسکمی فراگیر مغز از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌ها جلوگیری می کند(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 روش ها

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 طریفی در شاخه کاروتید خارجی ایجاد شد و همزمان با بستن قسمت پائین آن نخ نایلون آماده شده (شماره ۰-۳) 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 بهوش آمدن در محل گرم نگهداری می‌شد. در تمام دوره آزمایش تا خاتمه بیهوشی درجه حرارت حیوان با کمک لامپ گرم کننده در محدوده ۳۸-۳۷ درجه سانتیگراد ثابت نگه‌داشته می‌شد. بعد از هوشیاری کامل، حیوان را به قفس منتقل می‌شد و تا انجام آزمایش‌های بعدی در شرایط مناسب نگهداری می گردید.

پروتکل و گروه‌های آزمایشی

پروتکل و گروه‌های آزمایشی در این تحقیق به صورت زیر انجام شد و حیوانات مورد نظر به صورت تصادفی در۳ 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-07]

بیرون کشیدن آهسته نخ شروع شد و بعد از ۱۵ دقیقه محل جراحی بخیه زده شد و حیوان در محل مناسب نگهداری می‌شد. ارزیابی اختلالات عصبی- حرکتی ۲۴ ساعت بعد از شروع مرحله خونرسانی مجدد در حیواناتی که زنده می‌ماندند، انجام می‌گردید. 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 می‌شدند.

۳- گروه ایسکمی- خونرسانی مجدد و درمان با فولرنول (IR+ Fullerenol, n=۸): 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 پروتکل‌ها و جراحی جهت فیلامان‌گذاری 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 آماده‌سازی فولرنول برای تزریق، ابتدا پودر خریداری شده توسط ترازوی دقیق دیجیتالی وزن شد و به صورت تازه با محلول نرمال سالین حل می‌شد. 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 می‌شد. 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 می‌شد.

ارزیابی اختلالات عصبی- حرکتی

در حیواناتی که تا ۲۴ ساعت بعد از پایان دوره ایسکمی زنده می‌ماندند اختلالات عصبی- حرکتی با بکارگیری تست پنج نمره‌ای توسط فردی که نسبت به گروه تیمار شده آگاهی نداشت، مورد ارزیابی قرار 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 می‌شد که هیچگونه اختلال حرکتی نشان نمی‌دادند (حیوانات گروه شاهد). نمره ۲ برای حیوانی در نظر گرفته می‌شد که دست سمت متقابل نیمکره ایسکمی شده (دست چپ) را موقع آویزان شدن از دم خم می‌نمود (حالت Flexion). نمره ۳ به حیوانی تعلق می‌گرفت که در شروع حرکت در یک سطح صاف به سمت متقابل نیمکره ایسکمی شده (سمت چپ) می‌چرخید و حیوانی که رفلکس ایستادن را از دست داده بود نمره ۴ و در نهایت نمره ۵ به حیواناتی داده می‌شد که فاقد هر گونه حرکت خودبخودی بودند.

اندازه گیری حجم ضایعه مغزی

به این منظور، حیوانات گروه شاهد ۲۴ ساعت پس از جراحی و گروه‌های ایسکمی (کنترل ایسکمی و ایسکمی درمان شده) ۲۴ ساعت پس از آغاز خونرسانی مجدد توسط کتامین به طور عمیق بیهوش گردیدند. جهت اندازه‌گیری 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 میلی‌متر تهیه و جهت رنگ آمیزی به مدت ۲۰ دقیقه در محلول ۲ درصد تری فنیل تترازولیوم کلراید (TTC) گذاشته شدند. در این روش رنگ آمیزی، ناحیه ایسکمی شده مغز به رنگ سفید و نواحی سالم به رنگ قرمز آجری در می‌آید. برش‌های 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 به‌طور جداگانه توسط دوربین دیجیتال (Cannon, Japan) عکس گرفته شد و با استفاده از کامپیوتر و نرم‌افزار مخصوص (NIH image Analyzer) حجم ناحیه ضایعه دیده با

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-07]

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 گروه‌های ایسکمی (کنترل ایسکمی و ایسکمی درمان شده) ۲۴ ساعت پس از آغاز خونرسانی مجدد توسط کتامین به‌طور عمیق بیهوش گردیدند. جهت اندازه‌گیری ادم مغزی نیمکره ایسکمی شده، ابتدا پیاز بویایی و پل مغزی جداشد 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 اندازه‌گیری 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 گروه‌های ایسکمی تعیین شد(۳۳).

1- $\%H2O = [(WW-DW)/WW] \times 100$

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 سانتی‌گراد انتقال یافت. برای تعیین محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها و میزان مالون‌دی‌آلدئید (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 هموژنیزه 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 هموژنه، ۱/۵ میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک (TCA) ۱۰ درصد اضافه و به‌مدت ۱۰دقیقه سانتریفوژ شد، سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی را برداشته و ۲ میلی‌لیتر اسیدتیوباربیتوریک ۰/۶۷ درصد به آن اضافه شد و به‌مدت ۳۰دقیقه در بن‌ماری جوش قرار گرفت؛ سپس ۲ میلی‌لیتر ۱- بوتانل به محلول اضافه شد و بعد از ورتکس شدید، به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. جذب محلول رویی صورتی‌رنگ به‌وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر (CECIL-2501, England) در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت گردید. غلظت MDA، با استفاده از ۱، ۱، ۳ و ۳ تترا اتوکسی‌پروپان به‌عنوان استاندارد، تعیین و MDA برحسب میکروگرم بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد. محلول استاندارد MDA در غلظت‌های ۰/۲-۲۰ میکرومولار در اسیدسولفوریک ۱۰درصد 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 میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر 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 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آلبومین سرم گاوی (BSA) تهیه گردید. سپس غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از آن ساخته و به‌عنوان غلظت‌های استاندارد به کار برده شد.

روش آنالیز آماری

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

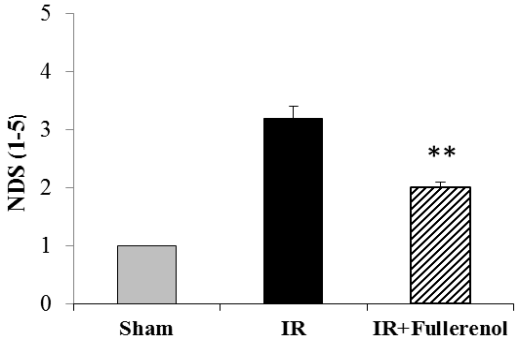
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-07]

استفاده شد. در تمامی مقایسه‌ها $p<0/05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار 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 ۰/۲۰±۳/۲۰ 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 (۰/۱±۲/۱). این کاهش در مقایسه با گروه ایسکمی- خونرسانی مجدد درمان نشده از نظر آماری معنی داری بود ($p<0/01$).



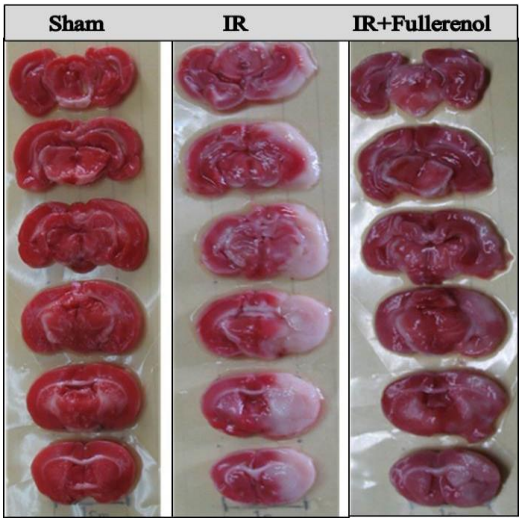
تصویر شماره ۱: اختلالات عصبی- حرکتی ۲۴ ساعت بعد از شروع خونرسانی مجدد در گروه های مورد آزمایش: گروه شاهد (Sham)، گروه ایسکمی- خونرسانی مجدد (IR) و گروه ایسکمی-خونرسانی مجدد درمان شده با فولرنول (IR+Fullerenol)

داده‌ها به صورت mean±SEM نشان داده شده است.

** نشانگر تفاوت معنی‌دار 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 رنگ‌آمیزیTTC 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 نسبتا 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.

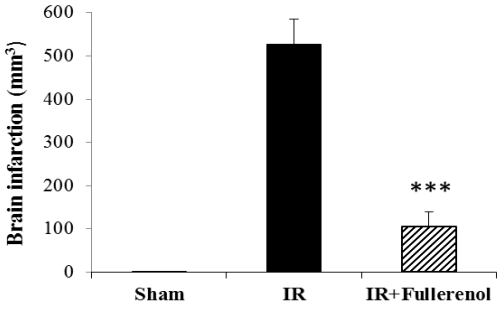


تصویر شماره ۲: تصاویر تهیه شده از مقاطع کرونال بافت مغز و رنگ آمیزی به روش TTC در پایان ۲۴ ساعت خونرسانی مجدد در گروه های مورد آزمایش: گروه شاهد (Sham)، گروه ایسکمی- خونرسانی مجدد (IR) و گروه ایسکمی- خونرسانی مجدد درمان شده با فولرنول (IR+Fullerenol). مناطق سفیدرنگ نشان دهنده ناحیه ایسکمی و مناطق قرمز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

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-07]

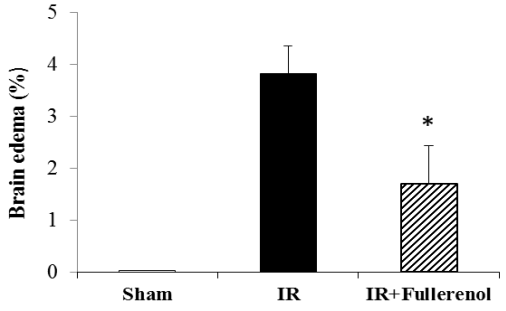
گروه‌های شاهد، ایسکمی- خونرسانی مجدد و ایسکمی- خونرسانی مجدد درمان شده با فولرنول را نشان داده است. مجموع ضایعه کل نیمکره ایسکمی شده در حیوانات گروه ایسکمی- خونرسانی مجدد $۵۲۷\pm۵۹\ mm^3$ بود. دریافت فولرنول به میزان ۱۰ mg/kg بلافاصله در آغاز مرحله خونرسانی مجدد مقادیر حجم ضایعه کل را در گروه ایسکمی- خونرسانی مجدد درمان شده به طور معنی‌داری کاهش داد ($p<۰/۰۰۱$)، که میزان آن $۱۰۶\pm۳۳\ mm^3$ بود.



تصویر شماره ۳: میزان حجم ضایعه نیمکره ایسکمی شده بر حسب میلیمتر مکعب (mm^3) 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).
داده ها به صورت mean±SEM نشان داده شده است.
*** نشانگر تفاوت معنی‌دار با $p<۰/۰۰۱$ در مقایسه با گروه ایسکمی- خونرسانی مجدد (IR)

نتایج درصد ادم مغزی

مقادیر تشکیل ادم مغزی (درصد) نیمکره‌های راست مغز در تصویر شماره ۳ برای گروه‌های 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 درگروه ایسکمی- خونرسانی مجدد این میزان افزایش قابل ملاحظه‌ای یافت و میزان آن ۳/۸۳±۰/۵۳ درصد بود. دریافت فولرنول به میزان ۱۰ mg/kg بلافاصله در آغاز مرحله خونرسانی مجدد میانگین درصد ادم نیمکره ایسکمی شده مغز را در گروه ایسکمی- خونرسانی مجدد درمان شده به طور معنی‌داری کاهش داد ($p<۰/۰۵$)، که میزان آن ۱/۷۰±۰/۷۴ درصد بود.

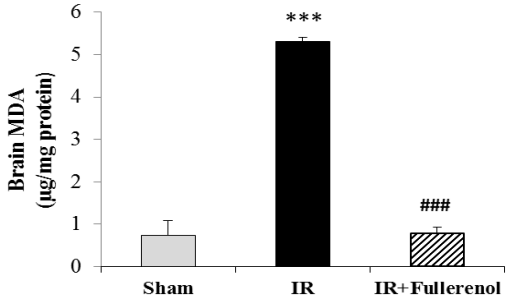


تصویر شماره ۴: مقادیر درصد ادم مغزی نیمکره راست ۲۴ ساعت بعد از شروع خونرسانی مجدد در گروه های مورد آزمایش: گروه شاهد (Sham)، گروه ایسکمی- خونرسانی مجدد (IR) و گروه ایسکمی- خونرسانی مجدد درمان شده با فولرنول (IR+Fullerenol).
داده ها به صورت mean±SEM نشان داده شده است.
** نشانگر تفاوت معنی دار با $p<۰/۰۵$ در مقایسه با گروه ایسکمی- خونرسانی مجدد (IR)

نتایج غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA)

تصویر شماره ۵ نتایج به‌دست آمده از غلظت مالون‌دی آلدئید نیمکره ایسکمی مغز بر حسب میکروگرم بر میلی گرم پروتئین (µg/mg protein) که شاخص تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد را در گروه‌های آزمایشی نشان می‌دهد. میانگین غلظت مالون‌دی آلدئید نیمکره راست حیوانات گروه شاهد protein µg/mg ۰/۷۴±۰/۳۴ بود. مقادیر عددی این متغیر در گروه کنترل ایسکمی- خونرسانی مجدد افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت ($p<۰/۰۰۱$)، و میزان آن برابر با protein µg/mg ۵/۳۰±۰/۱۱ بود. دریافت فولرنول درآغاز مرحله خونرسانی مجدد مقادیر غلظت مالون‌دی آلدئید نیمکره ایسکمی مغز را در گروه ایسکمی- خونرسانی مجدد درمان شده به طور معنی داری کاهش داد ($p<۰/۰۰۱$)، که میزان آن protein µg/mg ۰/۷۸±۰/۱۶ بود.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-07]



تصویر شماره ۵: مقدار مالون‌دی‌آلدئید (MDA) مغز بر حسب میکروگرم بر میلی‌گرم پروتئین (µg/mg protein) 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).
داده ها به صورت mean±SEM نشان داده شده است.
*** نشانگر تفاوت معنی دار با p<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه شاهد (Sham)
###نشانگر تفاوت معنی دار با p<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه ایسکمی- خونرسانی مجدد (IR)

بحث

نقش رادیکال‌های آزاد اکسیژن در پاتوفیزیولوژی و تشدید آسیب‌های 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 آنتی‌اکسیدانی دارند و در این میان برخی مشتقات محلول در آب نانوذرات فولرن توجه محققین زیادی را در جلوگیری از آسیب‌های مختلف بدن در شرایط پاتولوژیک که رادیکال‌های آزاد اکسیژن در پاتوفیزیولوژی آن‌ها 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 آسیب‌های ناشی از ایسکمی- خونرسانی مجدد مغز منجمله حجم ضایعه و ادم مغزی را به مقدار قابل ملاحظه‌ای کاهش دهد. همچنین استفاده از این نانوذره میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن که بعد از القاء ایسکمی- خونرسانی مجدد به 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 استراتژی‌های درمان در سکته 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 سلول‌ها و برداشت مواد زائد به نظر می‌رسد شدت آسیب‌های ایسکمی را کاهش دهد اما مسیرها و سیگنال‌های مخرب سلولی گسترده‌ای در این ناحیه فعال شده منجر به ایجاد آسیب‌های خونرسانی مجدد می‌گردد(۴۰،۵). در تحقیق حاضر القاء ایسکمی- خونرسانی مجدد توانست به میزان گسترده‌ای تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن را به همراه ضایعه وسیع در نیمکره ایسکمی شده ایجاد نماید. موازی با این تغییرات به میزان گسترده‌ای اختلالات عصبی- حرکتی در این حیوانات ظاهر شد. یکی از مسیرهای مخرب که نقش کلیدی در آسیب‌های خونرسانی مجدد بعد از بروز ایسکمی دارد، تولید انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد(۴۱). افزایش تولید انواع رادیکال‌های آزاد به دلایل مختلفی در نیمکره ایسکمی شده به‌وجود می‌آید. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد بعد از ایسکمی مغز سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی مغز تضعیف شده و حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید شده مخصوصاً در مرحله خونرسانی مجدد دچار نقص می‌گردد(۴۲،۴۱). از مهم‌ترین آنزیم‌ها که در طول ایسکمی- خونرسانی مجدد مغز دچار کاهش مقدار و فعالیت می‌شوند آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز هستند(۴۴-۴۲). همچنین مشخص شده میزان و فعالیت آنزیم‌های تولیدکننده انواع رادیکال‌های آزاد بعد از بروز ایسکمی افزایش می‌یابد. از بین این آنزیم‌ها NADPH-اکسیداز و گزانتین اکسیداز بسیار مهم هستند(۴۶،۴۵). افزایش میزان

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-07]

رادیکال‌های آزاد در تحقیق حاضر که افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید نیمکره ایسکمی شده هم گویای 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(۵۰،۴۹). در نهایت ترکیب این رادیکال‌ها با رادیکال‌های آزاد نیتروژن (نیتریک اکساید) باعث ایجاد ترکیب بسیار خطرناکی در ناحیه ایسکمی به نام پراکسی نیتریت می‌شود که مهم‌ترین عامل نکروز بافتی و تحریک 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(۳۹،۲۰) به‌طوری که محققین به دلیل خاصیت روبشی نانوذرات فولرن در جمع‌آوری انواع رادیکال‌های آزاد اصطلاحا 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 فولرن هیدروکسیله از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدها، سبب محافظت نورون‌ها می‌گردد(۲۰). درنهایت، گزارش شده، فولرن 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 مغز یکی از مهم‌ترین عوارض سکته مغزی بوده و بررسی‌های اخیر نشان می‌دهد ادم مغز سبب افزایش میزان درصد مرگ و میر بیماران سکته 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 سکته مغزی دارند(۵۴،۳۷). گزارش شده تولید رادیکال‌های آزاد در مرحله خونرسانی مجدد منجر به انقباض پریسایت‌های موجود در دیواره مویرگ‌های مغزی می‌شود که از

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-07]

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 روبشی 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 احتمالا استفاده از این نانوذرات از طریق کاهش تجمع رادیکال‌های آزاد در منطقه ایسکمی از آسیب به عروق مغزی جلوگیری 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 سکته 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 اساس نتایج این تحقیق می‌توان نتیجه‌گیری کرد فولرنول می‌تواند به‌عنوان یک عامل مؤثر در پیشگیری یا کاهش عوارض سکته مغزی به‌خصوص در مرحله خونرسانی مجدد مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل نتایج پایان نامه دکتری می‌باشد. بدین‌وسیله 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.

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-07]

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, Ingegni 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. Margaill 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 C_{60} 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 (C_{60}). Biomaterials 2008; 29(26): 3561-3573.
19. Rade I, Biljana G, Aleksandar D, Borut S. Bioapplication and activity of fullerenol C_{60}(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 C_{60} (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 fullerenol on cultured hippocampal neuron viability. Int J Nanomedicine 2012; 7: 3099-3109.
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): 129-135.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-07]

24. Mirkov SM, Djordjevic AN, Andric NL, Andric SA, Kostic TS, Bogdanovic GM, et al. Nitric oxide-scavenging activity of polyhydroxylated fullerenol, $C_{60}(OH)_{24}$. 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 fullerenol $C_{60}(OH)_{24}$ 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 fullerenol $C_{60}(OH)_{24}$ 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 peroxylipid 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-07]

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, Tarık 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-dimethamidodibenzopyriodonium 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-07]

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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-07]