Physiology and Pharmacology, 14 (1), 23 - 33
Spring 2010 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Inhibition of nitric oxide synthase activity improves focal cerebral damage induced by cerebral ischemia/reperfusion in normotensive rats

Mohammad Taghi Mohammadi, Seyed Mostafa Shid Moosavi, Gholam Abbas Dehghani*

Department of physiology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Received: 18 Dec 2009 **Accepted: 10 Feb. 2010**

Abstract

Introduction: Nitric oxide seems to play a dual role in ischemia/reperfusion injury. Few studies have investigated whether it exacerbates or improves brain edema. In the present study, we inhibited the activity of nitric oxide synthase by L-NAME and evaluated the cerebral infarct volume, tissue swelling and brain edema, alongside the measurement of blood flow of the ischemic region.

Methods: Transient focal cerebral ischemia was induced by 60 min middle cerebral artery occlusion followed by 12 hours reperfusion in rat. Experiments were performed in three groups of rats (n=12 each); Sham, control ischemic, and L-NAME pretreated (1 mg/kg IP). Laser Doppler flowmetry was used to measure the regional blood flow. After neurological deficit score (NDS) testing, the brains were prepared for TTC staining or brain water content technique to measure the infarct volume and brain edema.

Results: Pretreatment with L-NAME significantly reduced NDS (3.66 ± 0.33 to 1.5 ± 0.34), infarct volume of cortex (374 ± 34 to 160 ± 41 mm3) and striatum (158 ± 15 to 87 ± 16 mm3), tissue swelling (7.35 ± 1.27% to 4.05 ± 0.91%) and brain edema (3.5 ± 0.48% to 1.6 ± 0.6%) without significant alteration of blood flow of the ischemic region.

Conclusion: The findings of this study indicate that inhibition of nitric oxide synthase activity reduces infarct volume and brain edema of the ischemic region induced during 60 min middle cerebral artery occlusion. This effect is not accompanied with any alteration in the blood flow of the ischemic region.

Key words: Ischemia/reperfusion injury; Nitric oxide synthase; L-NAME; Regional blood flow; Neurological deficit; Brain edema

* Corresponding author e-mail: dehghang@sums.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۴ (۱)، ۲۳ – ۳۳
بهار ۱۳۸۹

IRANIAN SOCIETY OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY
انجمن فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران
تأسیس ۱۳۳۷

مهار فعالیت آنزیم نیتریک اکساید سینتاز آسیب های موضعی مغزی ناشی از ایسکمی– خون رسانی مجدد را در موش صحرایی با فشار خون نرمال بهبود می بخشد

محمدتقی محمدی، سید مصطفی شید موسوی، غلامعباس دهقانی*
گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

دریافت: ۲۷ آبان ۸۸ پذیرش: ۲۱ بهمن ۸۸

چکیده

مقدمه: نیتریک اکساید در آسیب های مغزی ناشی از ایسکمی نقش دوگانه ای داشته ولی هنوز تاثیر آن بر میزان جریان خون ناحیه ایسکمی شده و دخالت آن در تشدید یا تخفیف ادم مغزی مشخص نشده است. لذا در این تحقیق سعی شده تا قبل، حین و بعد از ایسکمی میزان جریان خون ناحیه درگیر مغز اندازه گیری و تاثیر مهار آنزیم نیتریک اکساید سینتاز با کمک L-NAME مورد مطالعه قرار گرفته و همزمان اثر آن بر حجم ضایعه ناحیه ایسکمی شده و میزان ادم مغزی مشخص گردد.

روش‌ها: در این مطالعه از مدل ایسکمی موضعی–موقتی با ۶۰ دقیقه انسداد شریان میانی مغز و ۱۲ ساعت خون رسانی مجدد استفاده گردید. سه گروه ۱۲ تایی موش صحرایی، گروه شاهد، گروه ایسکمی درمان نشده و پیش درمان شده با L-NAME (۱ mg/kg, IP) استفاده گردید. جریان خون ناحیه ای با کمک لیزر داپلر اندازه گیری شده و پس از ارزیابی اختلالات عصبی–حرکتی مغز حیوانات به طور جداگانه برای تعیین حجم ضایعه با روش TTC و یا اندازه گیری درصد آب بافتی و ادم مغزی مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته‌ها: در گروه پیش درمان شده اختلالات عصبی–حرکتی در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی به طور معنی داری از ۳/۶۶±۰/۳۳ به ۱/۵±۰/۳۴ کاهش پیدا کرد. همچنین به ترتیب حجم ضایعه کورتکس از ۳۷۴±۳۴mm^3 تا ۱۶۰±۴۱mm^3، استریاتوم از ۱۵۸±۱۵mm^3 تا ۸۷±۱۶mm^3 ، تورم بافتی از ۷/۳۵±۱/۲۷ ٪ تا۴/۰۵±۰/۹۱ ٪ و ادم مغزی از ۳/۵±۰/۴۸ ٪ تا ۱/۶±۰/۶ ٪ بدون اینکه بین میزان جریان خون منطقه ایسکمی دو گروه تفاوتی وجود داشته باشند کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان می دهد که مهار آنزیم نیتریک اکساید سینتاز حجم ضایعه و ادم مغزی ایجاد شده ناشی از انسداد موقت شریان میانی مغز را بدون تاثیر در جریان خون منطقه ایسکمی کاهش داده و باعث بهبودی اختلالات عصبی–حرکتی می شود.

واژه‌های کلیدی: ضایعه ایسکمی–خون رسانی مجدد، نیتریک اکساید سنتاز، L-NAME، جریان خون منطقه ایسکمی، اختلالات عصبی–حرکتی، ادم مغزی

مقدمه

وقوع سکته مغزی یکی از عوامل مهم مرگ و میر در سراسر جهان می باشد و بسیاری از مردم در دوره ای از حیات خود ممکن است با آن مواجه شوند [۷]. کاهش شدید و یا قطع موقتی جریان خون در یک ناحیه از مغز موجب ایسکمی شده و بعد از زمان کوتاهی سلولهای ناحیه مرکزی (core) از بین رفته ولی سلولهای اطراف آن، ناحیه محیطی (penumbra)، به دلیل

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: dehghang@sums.ac.i
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

دریافت خون از مناطق مجاور مدت زمان طولانی تری زنده می مانند [۶ و۱۱]. تحقیقات آزمایشگاهی نشان داده اگر همزمان با برقراری سریع و کافی جریان خون ناحیه ایسکمی داروهای ضد نوروتوکسیک استفاده شود مرگ سلولهای ناحیه محیطی به تاخیر افتاده و با ترمیم تدریجی آنها علاوه بر کاهش وسعت ناحیه محیطی ناحیه مرکزی نیز توسعه چندانی پیدا نمی کند [۲۷]. امروزه از مدل ایسکمی تجربی در حیوانات آزمایشگاهی با انسداد موقت شریان میانی مغز با انتخاب کنترل شده زمان و شدت ایسکمی علائمی مشابه سکته موقتی مغزی را در انسان ایجاد نموده و اثرات مواد تولید شده داخلی و یا داروها را بر تشدید و یا تخفیف علائم بالینی و پاتولوژیک سکته مغزی مورد مطالعه قرار می دهند [۴و۶].

جلوگیری از وقوع سکته مغزی بدلیل دخالت عوامل متنوع و عمدتا ناشناخته کار بسیار مشکلی است. به همین دلیل بسیاری از محققین تلاش می کنند تا در صورت وقوع سکته تا حد ممکن عوارض بعدی آن را تخفیف دهند. مطالعات دو دهه اخیر توجه ویژه ای به نقش نیتریک اکساید در زمان سکته مغزی داشته است [۵]. تحقیقات سالهای اخیر برای نیتریک اکساید در آسیب های ناشی از ایسکمی/خونرسانی مجدد مغز با توجه به شرایط آزمایش، طول دوره ایسکمی و زمان زنده ماندن حیوان نقش نوروپروتکتیو و نوروتوکسیک قائل شده اند [۲۶]. بر اساس نظر بعضی محققین مهار غیر اختصاصی آنزیم نیتریک اکساید سینتار (NO synthase, NOS) توسط L-NAME در مدل های مختلف ایسکمی مغزی در موش صحرایی اثرات بهبودی بخشی خوبی را نشان داده [۲و۵و۳۲]، درحالیکه گروهی دیگر در شرایط مشابه توقف تولید نیتریک اکساید بر ایسکمی را بی اثر [۱]، و یا مخرب دانسته اند [۳]. بعضی نیز بر این باورند که L-NAME و یا داروهای مشابه دیگر اثرات خود را بر جریان خون ناحیه ایسکمی در زمان ایسکمی و یا زمان برقراری مجدد جریان اعمال می کنند [۱۳]. تحقیقات قبلی این مرکز نشان داد که استفاده از L-NAME قبل و یا بعد از القاء ایسکمی اثر بهبودی بخشی خوبی بر رفتار حرکتی حیوان داشته و بطور چشمگیری حجم ضایعه مغزی را کاهش می دهد [۳۲]. ولی تحقیق یادشده و یا تحقیقات مشابه آن مشخص نمی کنند که آیا این اثرات با افزایش جریان خون ناحیه ایسکمی رابطه ای دارد یا خیر؟

یکی از شایع ترین عوارض ثانویه سکته مغزی ادم مغزی است که بعد از مدت کوتاهی در ناحیه آسیب دیده شروع شده و با گذشت زمان موجب تشدید آسیب ها می شود [۱۴و۲۴]. ادم یا به اصطلاح ورم مغزی با تجمع آب اضافی در پارانشیم مغز شروع شده و با بالابردن فشار داخل جمجمه جریان خون مغز را به شدت کاهش می دهد [۶ و۱۴و۲۹]. با همه گستردگی مطالعات، چون اثرات مهار تولید نیتریک اکساید در زمان ایسکمی کمتر مورد توجه قرار گرفته [۵]، و هنوز مشخص نیست آیا این ماده در تشدید و یا تخفیف ادم مغزی نقشی دارد یاخیر؟ لذا در این تحقیق سعی بر اینست علاوه بر اندازه گیری جریان خون ناحیه ایسکمی قبل، در زمان انسداد موقتی شریان میانی مغز و بعد از برقراری مجدد جریان خون (دوره بعد از القاء ایسکمی) آسیبهای ناشی از ایسکمی/خون رسانی مجدد نظیر اختلالات عصبی-حرکتی، حجم ضایعه مغزی بررسی شده و با پیش درمان حیوان با تجویز داخل صفاقی L-NAME و مهار تولید نیتریک اکساید علاوه بر پارامترهای فوق و شدت تورم بافتی و ادم مغزی و ارتباط احتمالی آنها با تغییرات جریان خون به خصوص بعد از بازگشائی شریان میانی مغز مشخص گردد.

مواد و روش ها

در این مطالعه از موش های صحرایی نر نژاد Sprague-Dawley تهیه شده از حیوان خانه دانشگاه علوم پزشکی شیراز با محدوده وزنی ۳۲۰-۲۸۰ گرم استفاده شد. تمامی آزمایشها طبق مقررات اخلاقی کار با حیوانات مصوب شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام گردید. حیوانات در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی، رطوبت مناسب، درجه حرارت $22\pm2\ ^{o}C$ و با دسترسی آزاد به آب و غذا تا روز آزمایش نگهداری می شدند.

برای ثبت جریان خون ناحیه ایسکمی مغز و فشار خون شریانی حیوان را با تزریق داخل صفاقی کلرال هیدرات (۴۰۰mg/kg) بیهوش نموده و به طور همزمان با تزریق سولفات آتروپین (۰/۵ mg/kg) ترشحات مجاری تنفسی کاهش داده شده تا طی جراحی و دوره آزمایش با مشکل

تنفسی مواجه نشود.

برای ثبت جریان خون ناحیه ای مغز (regional Cerebral Blood Flow, rCBF) از دستگاه لیزر داپلر فلومتری (AD instrument, model; ML191, Australia) استفاده گردید. برای انجام این کار ابتدا ناحیه بین گوش و چشم راست تراشیده و با برش دادن پوست و کنار زدن عضله تمپورالیس سطح استخوان تمیز گردیده و پروپ لیزر داپلر مستقیما بر روی استخوان جمجمه قرار داده می شد. بعد از تثبیت پروب در محل مناسب، عضله را بر روی آن برگردانده و پوست ناحیه برش داده شده را با دقت دوخته تا در طول آزمایش جابجا نشود. بر اساس تجربه و همچنین منابع محل قرارگرفتن پروب طوری انتخاب شد که همزمان با انسداد موقت دو کاروتید جریان خون کاهش یافته و با انسداد شریان میانی مغز جریان خون ناحیه مورد نظر تا حدود ۸۵-۷۵ درصد نسبت به قبل از انسداد کاهش یابد [۱۶]. ثبت پیوسته جریان خون ناحیه ای مغز در گروه شاهد در تمام طول دوره آزمایش و گروههای ایسکمی شده از ۱۵ دقیقه قبل از انسداد شریان میانی مغز تا ۱۵ دقیقه بعد از بازگشائی آن ادامه پیدا می کرد. همزمان با ثبت جریان خون در تعدادی از حیوانات با قرار دادن یک کانول پلی اتیلن در شریان دمی و با کمک ترانسدیوسر فشار و دستگاه (AD Power Lab instrument, model; ML786, Australia) فشار شریانی نیز اندازه گیری و به طور همزمان ثبت می گردید.

برای آماده سازی حیوان جهت ایجاد ایسکمی موقتی-موضعی مغز از روش ارائه شده توسط Longa و همکاران و اصلاح شده توسط وکیلی و همکاران استفاده گردید[۱۷و۳۲]. بعد از تثبیت حیوان بر روی میز جراحی، ناحیه گردن از وسط باز شده و بافت همبند وعضلات را کنار زده تا امکان دستری آسان به شریان کاروتید مشترک و شاخه های آن (خارجی و داخلی) فراهم گردد. در گروه ۲ و ۳ جهت القاء 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 (شماره۰-۳)، که نوک آن قبلا توسط حرارت گرد شده و سطح آن با پلی ال لیزین پوشانده شده، از راه شکاف وارد شریان داخلی و از آنجا به آرامی و بادقت 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، جریان خون ناحیه مورد نظر که توسط لیزر داپلر ثبت می شد، شدیدا کاهش پیدا می کرد. بعد از اطمینان از کاهش شدید خونرسانی، تا حدود ۷۵ تا ۸۵ درصد زمان قبل از انسداد با بررسی منحنی ثبت جریان خون ناحیه ایسکمی، نخ نایلون به مدت یک ساعت در محل تثبیت می شد. لازم به توضیح است که بر اساس تجربه مشخص گردید اگر کاهش جریان خون ناحیه مورد مطالعه (ناحیه ایسکمی) حدود ۶۰ درصد و یا کمتر باشد حجم ضایعه کم بوده و یا ممکن است اصلا ایجاد نشود. برای خاتمه ایسکمی و خون رسانی مجدد، نخ نایلون را به آرامی از رگ در آورده و با بستن شریان خارجی زخمهای ناحیه گردنی را بخیه زده و حیوان تا بهوش آمدن در محل گرم نگهداری می شد. در تمام دوره آزمایش تا خاتمه بیهوشی درجه حرارت حیوان با کمک لامپ گرم کننده در محدوده ۳۸-۳۷ درجه سانتیگراد ثابت نگه داشته و بعد از هوشیاری کامل به قفس منتقل نموده و تا انجام آزمایشهای بعدی در شرایط مناسب نگهداری می شد.

حیوانات گروه ۳ (گروه پیش درمان شده) ۲۰ دقیقه قبل از شروع آزمایش از محلول پیش ساخته L-NAME (N_{ω}-Nitro-L-Arginine Methyl Ester HCl, Fluka, Swiss) با غلظت ۱ mg/ml در نرمال سالین با حجمی برابر با ۱ ml/kg وزن بدن دریافت نموده و حیوانات گروه ۱ و ۲ (گروه شاهد ۹ گروه کنترل ایسکمی) معادل همین حجم از محلول نرمال سالین (۱ ml/kg BW) به عنوان حامل به بصورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند.

پروتکل و گروههای آزمایش به صورت زیر انجام شد: گروه ۱ یا گروه شاهد (n =۱۲): در این گروه عمل جراحی جهت گذاردن پروب لیزر داپلر در سطح جمجمه و آشکارسازی شریان کاروتید مشترک و شریانهای کاروتید خارجی و داخلی در ناحیه گردن انجام شده ولی عمل انسداد شریان میانی مغز صورت نمی پذیرفت ولی تمام اعمال دیگر از جمله تزریق حامل و ثبت پارامترهای مورد نظر مشابه گروههای دیگر بود. به دلیل عدم انسداد شریان میانی مغز، بعد از آماده سازی و رنگ آمیزی برشهای مغزی هیچگونه علامتی دال بر ایسکمی مغزی مشاهده نمی شد. ضمنا درصد

آب اندازه گیری شده دو نیمکره مغز حیوانات این گروه به عنوان شاهد نرمال برای گروههای بعدی استفاده گردید.

گروه ۲ یا گروه تحت ایسکمی/خونرسانی مجدد (۲۲= n): کلیه اعمال جراحی تا مرحله القای ایسکمی مشابه گروه ۱ می باشد. به هر حیوان ۲۰ دقیقه قبل از انسداد شریان میانی مغز از محلول حامل به صورت داخل صفاقی تزریق نموده و القای ایسکمی به مدت ۶۰ دقیقه دوام پیدا می کرد. مرحله خونرسانی مجدد با بیرون کشیدن آهسته نخ شروع شده، و بعد از ۱۵ دقیقه محل جراحی بخیه زده شده و حیوان در محل مناسب نگهداری می شد. با ارزیابی اختلالات عصبی- حرکتی، ۱۲ ساعت بعد از شروع مرحله خونرسانی مجدد در حیواناتی که زنده می ماندند، با تزریق داخل صفاقی تیوپنتال سدیم تحت بیهوشی عمیق حیوان را کشته، سر را جدا نموده و مغز را با احتیاط کامل از جمجمه خارج نموده و جهت بررسی حجم ضایعه مغزی، تورم بافتی ویا درصد آب بافتی و ادم مغزی به دو زیرگروه به صورت زیر آماده سازی می شد. تلفات این گروه قبل از شروع مرحله ارزیابی عصبی-حرکتی ۱۰ سر بود که نتایج آنها حذف گردید.

گروه ۲-الف (۶= n): مغز حیوان بعد از آماده سازی، تهیه برش ها و رنگ آمیزی جهت تعیین حجم ضایعه و تورم بافتی مورد استفاده قرار می گرفت.

گروه ۲-ب (۶= n): مغز حیوان بعداز آماده سازی به دو نیمکره راست (ضایعه دیده) و چپ (سالم) تقسیم شده و بطور جداگانه درصد آب هر نیمکره اندازه گیری و درصد ادم مغزی محاسبه می گردید.

گروه ۳ یا گروه تحت ایسکمی/خونرسانی مجدد پیش درمان شده با L-NAME (۲۰= n): کلیه اعمال جراحی این گروه مشابه گروه ۲ می باشد. هر حیوان۲۰ دقیقه قبل از انسداد شریان میانی مغز ۱ ml/kg از محلول L-NAME دریافت نموده و سپس کلیه مراحل ایجاد ایسکمی/ خونرسانی مجدد مشابه گروه ۲ تکرار می گردید. در حیواناتی که زنده می ماندند ارزیابی اختلالات عصبی-حرکتی ۱۲ ساعت بعد از شروع مرحله خون رسانی مجدد تکمیل گردیده، همانند گروه ۲، حیوانات این گروه به طور تصادفی در دو زیرگروه به شرح زیر وارد می شدند. تعداد ۸ سر از حیوانات این گروه قبل از رسیدن به مرحله ارزیابی عصبی-حرکتی تلف شده و نتایج آنها حذف گردید.

گروه ۳-الف (۶= n): بعد از آماده سازی، مغز حیوان جهت رنگ آمیزی برش داده شده و برای تعیین حجم ضایعه و تورم بافتی مورد استفاده قرار می گرفت.

گروه ۳-ب (۶= n): مغز حیوان بعداز آماده سازی به دو نیمکره راست (ضایعه دیده) و چپ (سالم) تقسیم شده و درصد آب هر نیمکره اندازه گیری و درصد ادم مغزی ایجاد شده مشخص می گردید.

درحیواناتی که تا ۱۲ ساعت بعد از پایان دوره ایسکمی زنده می ماندند اختلالات عصبی- حرکتی با بکارگیری تست پنج نمره ای شرح داده شده توسط پناهپور و همکاران مورد ارزیابی قرار می گرفت [۲۲]. 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، از جمله حیوانات گروه شاهد، که هیچگونه اختلال حرکتی نشان نمی دادند. 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 نمودند (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 (Righting reflex) را از دست داده بودند نمره ۴ و در نهایت نمره ۵ به حیواناتی داده می شد که فاقد هر گونه حرکت خودبخودی بودند.

با خاتمه بررسی اختلالات عصبی- حرکتی، حیوان را تحت بیهوشی عمیق با تزریق داخل صفاقی تیوپنتال سدیم کشته و مغز را طبق روش زیر گروه های۲- الف، ۲-ب،۳- الف و ۳-ب آماده سازی جهت بررسی حجم ضایعه مغزی، تورم بافتی (درصد آب بافتی)، و ادم مغزی به شرح زیر صورت می پذیرفت.

جهت اندازه گیری حجم ضایعه مغزی و تورم بافتی در نیمکره ایسکمی شده مغز را از جمجمه خارج نموده و به مدت ۵ دقیقه در نرمال سالین ۴ درجه قرار داده تا قوام پیدا کند، سپس با استفاده از Brain Matrix شش برش عرضی (coronal) به قطر ۲ میلیمتر تهیه و جهت رنگ آمیزی به مدت ۲۰ دقیقه در محلول ۲ درصد تری فنیل تترازولیوم

جدول ۱- میانگین متوسط فشار شریانی و متوسط جریان خون ناحیه ایسکمی

گروه	متوسط فشار شریانی در زمان (mmHg)			متوسط جریان خون موضعی مغزی در زمان (درصد پایه)	
	انسداد	خون رسانی مجدد	قبل از انسداد	انسداد	خون رسانی مجدد
۱	۷۱+۴	۷۱+۲	۱۰۰	۹۷+۱۰	۱۰۳+۱۰
۲	۷۰+۵	۶۹+۵	۱۰۰	۲۰+۲*	۹۵+۸
۳	۷۲±۷	۸۳±۸	۱۰۰	۲۰±۲*	۱۰۸±۱۵

داده ها به صورت Means ± SEM نشان داده شده است.

* نشانگر تفاوت معنی دار با زمان قبل از انسداد و همچنین نتایج گروه ۱ با $P<0.05$

کلراید (TTC) گذاشته می شدند [۲۲و۳۲]. در این روش رنگ آمیزی، ناحیه ایسکمی شده مغز به رنگ سفید و نواحی سالم به رنگ قرمز آجری در می آید (شکل ۱). برش های رنگ آمیزی شده را جهت تثبیت شدن به مدت ۲۴ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد بافر شده قرار داده و بعد از آماده سازی نهائی، از هر شش برش بطور جداگانه توسط دوربین دیجیتال (Cannon, Japan) عکس گرفته و با کمک نرم افزار کامپیوتری مخصوص (NIH image Analyzer) سطح ناحیه ضایعه دیده قسمت کورتکس و استریاتوم مشخص و حجم کل حجم ایسکمی مغز، بعد از حذف حجم ادم ایجاد شده، طبق روش وکیلی و همکاران محاسبه می گردید [۳۲].

شکل ۱- فوتوگراف تهیه شده از بافت مغز رنگ آمیزی شده به روش TTC ۱۲ ساعت بعد از خونرسانی مجدد. منطقه سفید نشان دهنده ناحیه ایسکمی و منطقه قرمز نشان دهنده قسمت سالم مغز است.

برای تعیین درصد تورم بافتی (Tissue Swelling) از روش سوانسون و همکاران استفاده نموده و بعد از تعیین حجم دو نیمکره ضایعه دیده راست (V_{RH}) و سالم چپ (V_{LH}) با استفاده از برشهای رنگ آمیزی شده با استفاده از فرمول شماره ۱ درصد تورم بافتی مشخص می گردید[۳۰].

1- $\%Tissue\ Swelling = [(V_{RH}-V_{LH})/ V_{LH}] \times 100$

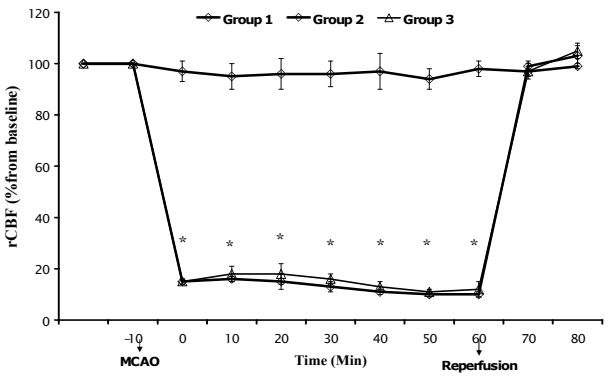
جهت اندازه گیری ادم نیمکره ایسکمی شده از روش گرتیس استفاده گردید [۹]. ابتدا بعد از خارج نمودن مغز از جمجمه پیاز بویایی و پل مغزی را جدا نموده، و با کمک Brain Matrix مغز را با دقت کامل به دو نیمکره راست (ضایعه دیده) و چپ (سالم) تقسیم نموده و وزن مرطوب (WW) دو نیمکره با کمک ترازوی دقیق دیجیتالی اندازه گیری شد.

سپس با قرار دادن آنها به مدت ۲۴ ساعت در آون ۱۱۰°C، وزن خشک (DW) هر نیمکره جداگانه مشخص گردیده و با استفاده از فرمول ۲ درصد آب دو نیمکره راست ($\%WC_{RH}$) و چپ ($\%WC_{LH}$) محاسبه و با کمک فرمول ۳ درصد ادم مغزی نیمکره ایسکمی مشخص می گردید.

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

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

نتایج به دست آمده به صورت میانگین ± انحراف معیار نمونه (Mean±SEM) ارائه شده است. برای مقایسه اختلالات عصبی- حرکتی، حجم ضایعه، در صد آب مغزی و ادم از روش مقایسه ای Nonparametric و تست آماری Kruskal-Wallis استفاده شد. برای داده های میانگین متوسط فشار شریانی و جریان خون مغزی از روش Repeated measurement استفاده شد. در تمام مقایسه ها



شکل ۲- جریان خون ناحیه ایسکمی (Regional cerebral blood flow, rCBF) بر پایه درصد جریان خون پایه (% from baseline) قبل، حین، و بعد از انسداد شریان میانی مغز (MCAO) در گروه ۲ و گروه ۳، داده ها به صورت Means ± SEM نشان داده شده است.

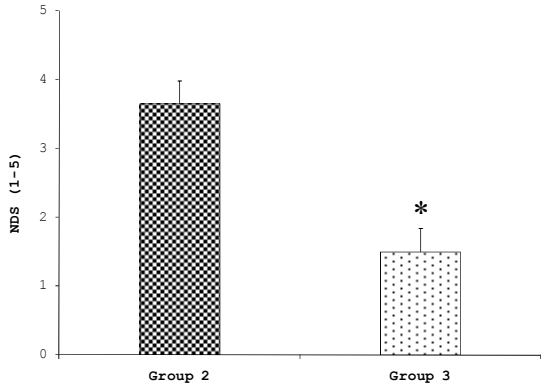
* نشانگر تفاوت معنی دار با P < ۰/۰۵ با گروه ۱ و داده های قبل از انسداد شریان میانی مغز

P<۰/۰۵ به عنوان اختلاف معنی دار تلقی گردید.

یافته ها

میانگین متوسط فشار شریانی تمامی گروهها برای۶۰ دقیقه دوره ایسکمی و ۱۵ دقیقه اول دوره خون رسانی مجدد در جدول شماره ۱ آورده شده است. مقایسه آماری این داده ها در طول دوره آزمایش در هر گروه و در بین گروهها از لحاظ آماری تفاوت معنی داری نداشت.

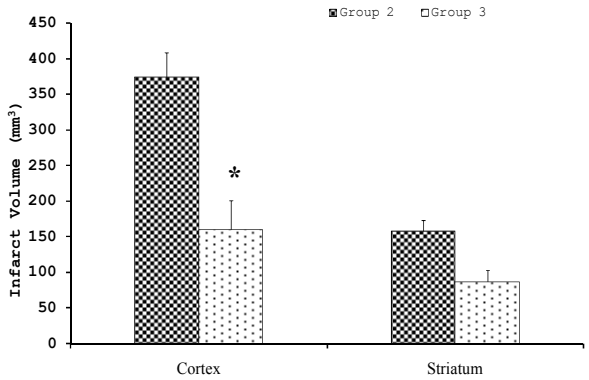
تغییرات مداوم جریان خون ناحیه ثبت شده در طی دوره آزمایش در گروه ۱ و دو گروه ایسکمی از ۱۵ دقیقه قبل از انسداد شریان میانی مغز،۶۰ دقیقه دوره ایسکمی تا ۱۵ دقیقه اول خون رسانی مجدد در شکل ۲ و زمانهای مشخص شده در جدول ۱ نمایش داده شده است. همانطوریکه شکل ۲ مشخص می کند با انسداد شریان میانی مغز جریان خون ناحیه ایسکمی گروه های ۲و ۳، که بطور طبیعی از این شریان مشروب می شدند، حدود ۸۵-۷۵ درصد کمتر از زمان قبل انسداد و یا زمان خون رسانی مجدد بود. ضمنا در طی۶۰ دقیقه دوره انسداد تغییر قابل ملاحظه در جریان خون کاهش یافته در گروههای ایسکمی مشاهده نگردید. بعد از باز کردن شریان میانی مغز جریان خون به سرعت و تا حد قبل از انسداد بدون آنکه بین میانگین آنها از نظر آماری تفاوت قابل ملاحظه ای وجود داشته باشد، بالا رفت. پیش درمان با



شکل ۳- اثرات L-NAME بر روی اختلالات عصبی- حرکتی (Neurological deficit score, NDS) ۱۲ ساعت بعد از خون رسانی مجدد. داده ها به صورت Means ±SEM نشان داده شده است.

* نشانگرتفاوت معنی دار با P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه ۲

L-NAME در گروه ۳ اختلالات عصبی-حرکتی را در مقایسه با گروه ۲ (کنترل ایسکمی) به طور معنی داری از ۳/۶۶±۰/۳۳ به ۱/۵±۰/۳۴ کاهش داده (شکل ۳) و موجب بهبودی اختلالات حرکتی گردید. در گروه ۲ حجم ضایعه مغزی ایجاد شده در کورتکس و استریاتوم به ترتیب $۳۷۴±۳۴mm^3$ و $۱۵۸±۱۵mm^3$ بود (شکل۴). در گروه ۳ حجم ضایعه کورتکس حدود ۵۱ درصد ($۱۶۰±۴۱mm^3$) و استریاتوم حدود ۳۵ درصد ($۸۷±۱۶mm^3$) کاهش پیدا کرد که در مقایسه با نتایج گروه ۲ این کاهش قابل ملاحظه بود (شکل۴). جهت مشاهده تفاوت کیفی بین گروهها به شکل ۱ مراجعه شود. بررسی شکل ۵ نشان می دهد که با ایجاد ضایعه مغزی در گروه ۲ تورم بافتی معادل ۷/۳۵±۱/۲۷ درصد ایجاد شده در حالیکه در گروه ۳ میزان آن حدود ۴۴ درصد کمتر بود (۴/۰۵±۰/۹۱ درصد). میزان درصد آب نیمکره های راست و چپ گروه ۱ به ترتیب ۷۸/۶۴±۰/۲ درصد (راست) و ۷۸/۲۴±۰/۱۶ درصد (چپ)، گروه ۲ به ترتیب ۸۱/۹۶±۰/۵ درصد (ضایعه دیده) و ۷۸/۴۷±۰/۹ درصد (سالم)، گروه۳ به ترتیب ۷۹/۴۶±۰/۷ درصد (ضایعه دیده) و ۷۷/۸۶ ±۰/۶ درصد (سالم) می باشد (شکل ۵). همانطوری که در شکل ۶ نشان داده شده در گروه ۱ بدلیل سالم بودن مغز بین درصد آب دو نیمکره راست و چپ تفاوت معنی داری وجود نداشت. در حالیکه در گروه ۲ درصد آب نیمکره ضایعه دیده (راست) را به طور قابل ملاحظه ای افزایش یافته است. در گروه ۳، پیش درمان شده با



شکل ۴- اثرات L-NAME بر روی حجم ضایعه مغزی ۱۲ ساعت بعد از خونرسانی مجدد به طور مجزا در کورتکس (Cortex) و استریاتوم (Striatum). داده ها به صورت Means ±SEM نشان داده شده است.

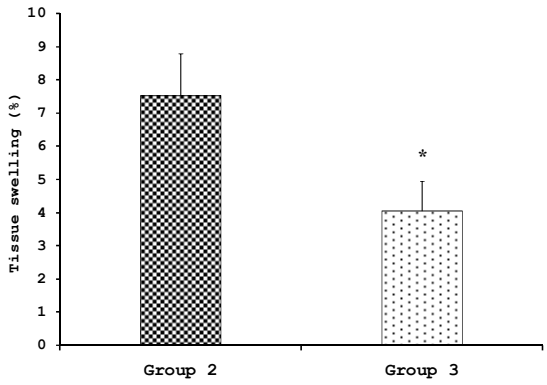
* نشانگرتفاوت معنی دار با P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه ۲

L-NAME، این افزایش به طور معنی داری از گروه درمان نشده (گروه ۲) کمتر بوده و از نظر آماری تفاوت معنی داری هم با گروه ۱ نداشت.

شدت ادم مغزی نیمکره ایسکمی شده گروه ۳، تحت درمان با L-NAME، ۱/۷±۰/۶۳ درصد است که در مقایسه با گروه ۲ (۳/۵۴±۰/۴۸ درصد) حدود ۵۴ درصد کمتر می باشد (شکل ۷).

بحث

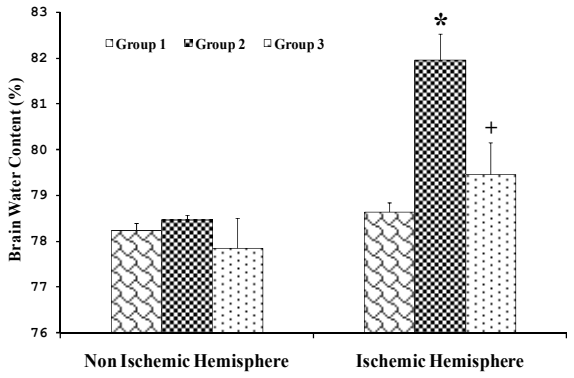
بررسی های محققین نشان می دهد تولید نیتریک اکساید همزمان با برقراری مجدد جریان خون افزایش می یابد [۵ و۱۲و۲۰]، ولی مطالعات انجام شده این ابهام را ایجاد کرده که توقف تولید نیتریک اکساید در زمان ایسکمی موضعی- موقتی مغزی نقش بعضا متضاد محافظتی و یا تخریبی دارد. بسیاری از محققان بر این باورند که توقف تولید نیتریک اکساید، توسط مهار کننده های غیر انتخابی نظیر L-NAME، آسیب های ناشی از ایسکمی مغزی را در مدلهای ایسکمی موضعی- موقتی و یا دائم مغزی تشدید می نماید [۱۵و۳۴]. درحالیکه گروهی دیگر در موشهای صحرائی پیش درمان شده با L-NAME اثرات بهبودی بخشی را برای توقف تولید نیتریک اکساید در ارتباط با اختلالات عصبی-حرکتی و کاهش حجم ضایعه در زمان ایسکمی موقت مغزی گزارش کرده اند [۳ و۵ و۱۸]. چون در این



شکل ۵- اثرات L-NAME بر روی درصد تورم بافتی (Tissue swelling %) ۱۲ ساعت بعد از خونرسانی مجدد. داده ها به صورت Means ±SEM نشان داده شده است.

* نشانگرتفاوت معنی دار با P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه ۲

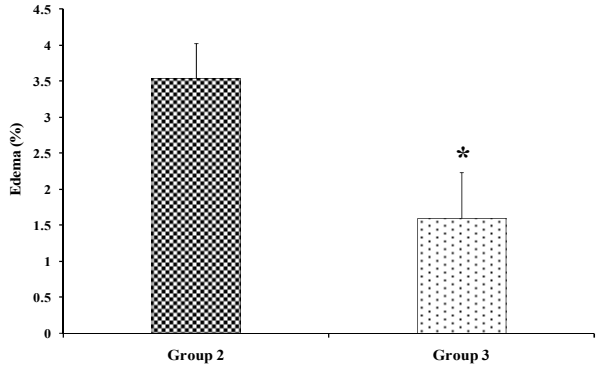
تحقیقات تغییرات فشار شریانی گزارش نشده و یا اینکه جریان خون ناحیه ایسکمی به خصوص در زمان خون رسانی مجدد اندازه گیری نگردیده، نمی توان کند شدن روند مرگ سلولی ناحیه محیطی منطقه ضایعه دیده و کاهش حجم ضایعه مغزی را مستقیما به اثرات مهاری تولید نیتریک اکساید ربط داد. همانطوریکه در مقدمه اشاره شد بعضی از محققین بر این باورند که اثرات بهبودی بخش توقف تولید نیتریک اکساید با افزایش فشار شریانی و به طبع آن جلوگیری از کاهش شدید جریان خون ناحیه صدمه دیده در زمان القای ایسکمی ارتباط داشته و بهبودی اختلالات عصبی- حرکتی و کاهش ضایعه مغزی را به افزایش جریان خون از طریق عروق جانبی ناحیه محیطی در طی دوره ایسکمی ارتباط می دهند [۱۳و۲۶و۲۸]. در تحقیق حاضر فشار شریانی و جریان خون ناحیه ایسکمی قبل، در زمان ایسکمی و شروع دوره برقراری مجدد جریان خون اندازه گیری شده و بر اساس نتایج گروه ۳، گروه پیش درمان شده با L-NAME، مشخص گردید عدم گسترش بیشتر مرگ سلولی در ناحیه محیطی منطقه ضایعه دیده، در مقایسه با گروه ۲، ارتباط چندانی با تغییر جریان خون ناحیه ایسکمی ندارد و دلیل بهبودی مشاهده شده در اختلالات عصبی- حرکتی کاهش حجم ضایعه مغزی می باشد (شکل ۴ و ۵). چون این تفاوتها در حالی اتفاق افتاده که اختلاف قابل ملاحظه ای بین جریان خون ناحیه ایسکمی دو گروه در زمانهای ذکر شده وجود نداشت (شکل ۲) بنابراین اثرات



شکل ۶- درصد محتوای آب مغز (Brain water content %) در نیمکره غیر ایسکمیک (Non ischemic hemisphere) و نیمکره ایسکمیک (Ischemic hemisphere) ۱۲ ساعت بعد از خونرسانی مجدد در گروه ۱، گروه ۲ و گروه ۳. داده ها به صورت Means ±SEM نشان داده شده است.
* نشانگر مقایسه معنی دار با P <۰/۰۵ با گروه ۱ و نیمکره غیر ایسکمیک
+ نشانگر مقایسه معنی دار با P< ۰/۰۵ با نیمکره ایسکمیک گروه ۲

بهبودی بخش مشاهده شده در گروه ۳، مهار تولید نیتریک اکساید توسط L-NAME، برخلاف نظر بعضی از محققین، ارتباطی با افزایش جریان خون ناحیه ایسکمی ندارد (جدول ۱ و شکل ۲) و این اثرات مفید را می توان مستقیما به کاهش فرآیند تخریب سلولی ناحیه محیطی منطقه ایسکمی در پاسخ به توقف نیتریک اکساید، نه افزایش جریان خون، نسبت داد.

ادم مغزی یکی از شایع ترین عوارض ثانویه و خطرساز سکته بوده که اندک زمانی بعد از ایسکمی مغزی شروع شده و با تداوم آن فشار داخل جمجمه بالا رفته و با کاهش بیشتر جریان خون مغز، بخصوص ناحیه ایسکمی، باعث تشدید ضایعه ناحیه آسیب دیده می شود [۶ و۲۴]. گرچه درباره تورم بافتی و ادم مغزی ناشی از سکته در مدل های حیوانی مطالعات کمتری صورت گرفته ولی بر اساس همین تحقیقات اندک مشخص شده که ادم مغزی دارای دو منشا عروقی (وازوژنیک) و سلولی (سیتوتوکسیک) می باشد [۲۳و۲۴]. بعد از وقوع ایسکمی با شکسته شدن سد خونی-مغزی نفوذپذیری عروقی افزایش یافته و شدت آن با میزان ضایعه مغزی در ارتباط می باشد [۸ و۱۰و۲۱و۲۵و۳۳]. برقراری مجدد ولی با تاخیر جریان خون بافتی به دنبال ایسکمی، معمولا نفوذپذیری عروقی مغز را افزایش داده و با ایجاد ادم مغزی علائم ایسکمی را وخیم تر می نماید [۱۹]. در زمان سکته مغزی به تدریج آب اضافی در پارانشیم مغز جمع شده و اگر به موقع با آن مقابله نشود ممکن است با تشدید گسترش



شکل ۷- اثرات L-NAME بر روی درصد تشکیل ادم مغزی ۱۲ ساعت بعد از خونرسانی مجدد. داده ها به صورت Means±SEM نشان داده شده است.
* نشانگرتفاوت معنی دار با P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه ۲

روند ایسکمی عوارض سکته مغزی را تا مرحله خطرناک و غیر قابل بازگشتی پیش ببرد [۲۴و۲۹].

در تحقیقات سالهای اخیر تا حد زیادی نقش مخرب نیتریک اکساید در آسیب های پاتولوژیکی سکته مغزی با توجه به شرایط آزمایش، طول دوره ایسکمی و زمان زنده ماندن حیوان مشخص شده است [۵ و۲۵و۳۱]. ولی با این همه مطالعات گسترده هنوز نقش اثرات افزایش و یا توقف تولید نیتریک اکساید در صدمه های ناشی از ایسکمی-خون رسانی مجدد در ارتباط با تشدید و یا تخفیف ادم مغزی به طور شفاف مشخص نشده است. نتایج این پژوهش نشان می دهد که ۱۲ ساعت بعد از برقراری مجدد جریان خون ناحیه ایسکمی شده تورم بافتی به بیش از ۷ درصد و ادم مغزی به بیش از ۳/۵ درصد رسیده (شکل ۵ و۶) درحالیکه با توقف تولید نیتریک اکساید ادم به مقدار زیادی کاهش پیدا می کند (به ترتیب ۵۴ و ۴۴ درصد) که با نتایج گزارش های Ding-Zhou همخوانی دارد [۵]. با توجه به اینکه فشار شریانی و جریان خون ثبت شده ناحیه ایسکمی در هر زمان از دوره آزمایش در دو گروه ۲ و ۳ (جدول ۱ و شکل ۲) باهم تفاوت معنی داری نداشت، اگر در باقیمانده زمان حیات حیوان تغییری در این دو پارامتر ایجاد نشده باشد، درصد کاهش ادم مغزی با فشار و جریان خون ارتباطی نداشته و باید عوامل ناشناخته دیگری در زمان توقف تولید نیتریک اکساید توسط L-NAME در تخفیف ادم دخالت داشته باشند که برای شناخت آنها تحقیقات بیشتری باید انجام شود. به طور خلاصه از نتایج این تحقیق چنین استنباط می شود که مهار

فعالیت آنزیم نیتریک اکساید سینتاز، با کمک مهار کننده غیر اختصاصی مانند L-NAME، قبل از القای ایسکمی بدون اینکه ارتباط چندانی با تغییرات فشار شریانی و جریان خون ناحیه ایسکمی داشته باشد با کاهش ادم و حجم ضایعه مغزی سبب بهبودی اختلالات عصبی-حرکتی می شود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز که هزینه های مالی این تحقیق را فراهم نموده (طرح شماره (۴۶۶۹-۸۸) و همچنین از آقایان دکتر حمدالله پناهپور، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل و دکتر عابدین وکیلی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان تشکر و قدردانی می شود.

References

[1] Buchan, AM, Gertler SZ, Huang ZG, Li H, Chaundy KE, Xue D, Failure to prevent selective CA1 neuronal death and reduce cortical infarction following cerebral ischemia with inhibition of nitric oxide synthase. ***Neuroscience*** 61 (1994) 1-11.

[2] Buisson A, Plotkine M, Boulu RG, The neuroprotective effect of a nitric oxide inhibitor in a rat model of focal cerebral ischaemia. ***Br J Pharmacol*** 106 (1992) 766-767.

[3] Carreau A, Duval D, Poignet H, Scatton B, Vige X, Nowicki JP, Neuroprotective efficacy of NN-nitro-L-arginine after focal cerebral ischemia in the mouse and inhibition of cortical nitric oxide synthase. ***Eur J Pharmacol*** 256 (1994) 241-249.

[4] Del Zoppo GJ, Hallenbeck JM, Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. ***Thrombosis research*** 98 (2000) 73-81.

[5] Ding-Zhou L, Marchand-Verrecchia C, Croci N, Plotkine M, Margaill I, L-NAME reduces infarction, neurological deficit and blood–brain barrier disruption following cerebral ischemia in mice. ***Eur J Pharmacol*** 457 (2002) 137-146.

[6] Dirnagl U, Idecola C, Moskowits MA, Phatophysiology of ischemic stroke: an integrated view. ***Trrends Neurosci*** 22 (1999) 391-397.

[7] Pérez-Asensio FJ, Hurtado O, Burguete MC, Moro MA, Salom JB, Lizasoain I, Torregrosa G, Leza JC, Alborch E, Castillo J, Knowles RG, Lorenzo P, Inhibition of iNOS activity by 1400W decreases glutamate release and ameliorates stroke outcome after experimental ischemia. ***Neurobiol Di***s 18 (2005) 375-384.

[8] Fischer S, Clauss M, Wiesnet M, Renz D, Schaper W, and Karliczek GF, Hypoxia induces permeability in brain microvessel endothelial cells via VEGF and NO. ***Am J Physiol Cell Physiol*** 276 (1999) C812–C820.

[9] Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Muller C, Kluge A, Kaps M, Fisher M, Bachmann G, 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 Protoc*** 12 (2004) 137–143.

[10] Hawkins BT, Davis TP, The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. ***Pharmacol Rev*** 57 (2005) 173–185.

[11] Hossmann KA, Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. ***Ann Neurol*** 36 (1994) 557-565.

[12] Iadecola, C, Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. ***Trends Neurosci*** 20 (1997)132–139.

[13] Iadecola C, Pelligrino DA, Moskowitz MA, Lassen NA, Nitric oxide synthase inhibition and cerebrovascular regulation. ***J Cereb Blood Flow Metab*** 14 (1994) 175–192.

[14] Kimelberg HK, Current concept of brain edema; Review of laboratory investigations. ***J Neurosurg*** 83 (1995) 1051-1059.

[15] Kuluz JW, Prado RJ, Dietrich WD, Schleien CL, Watson BD, The effect of nitric oxide synthase inhibition on infarct volume after reversible focal cerebral ischemia in conscious rats. ***Stroke*** 24(1993) 2023-2029.

[16] Lecrux C, Nicole O, Chazalviel L, Catone C, Chuquet J, MacKenzie ET and Touzani O, Spontaneously Hypertensive Rats Are Highly Vulnerable to AMPA-Induced Brain Lesions. ***Stroke*** 38 (2007) 3007-3015.

[17] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R, Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. ***Stroke*** 20 (1989) 84-91.

[18] Margaill I, Allix M, Boulu RG, Plotkine M, Dose- and timedependence of L-NAME neuroprotection in transient focal cerebral ischaemia in rats. ***Br J Pharmacol*** 120 (1997) 160–163.

[19] Nishimoto K, Karkari S, Pappius HM, Behavior of the blood–brain barrier in cerebral ischemia. In: Mrsulja B, Rakie LM, Klatzo I, editors. ***Pathophysiology of cerebral energy metabolism***. New York: Plenum Publishing Crop, 1979, p. 99-108.

[20] Ohta K, Graf R, Rosner, G, Kumura E, Heiss, WD, Profiles of cortical tissue depolarization in cat focal cerebral ischemia in relation to calcium ion homeostasis and nitric oxide production. ***J Cereb Blood Flow Metab*** 17 (1997) 1170–1181.

[21] lsson Y, Crowell RM, Klatzo I, The blood-brain barrier to protein tracers in focal cerebral ischemia and infarction caused by occlusion of the middle cerebral artery. ***Acta Neuropathol*** 18 (1971) 89-102.

[22] Panahpour H, Nekooeian AA, Dehghani GA, Inhibition of angiotensin–converting enzyme reduces cerebral infarct size in experimental-induced focal cerebral-ischemia in the rat. ***Iran J Med Sci*** 23 (2007) 12-17.

[23] Papadopoulos MC, Binder DK, Verkman AS, Enhanced mulcollar diffusion in brain extracellular space in mouse models of vasogenic edema measured by cortical surface photobleaching. ***FASEB J*** 19 (2005) 425-427.

[24] Papadopoulos MC, Verkman AS, Aquaporin-4 and brain edema. ***Pediatr Nephrol*** 22 (2007) 778-784.

[25] Parathath SR, Parathath S, Tsirka SE, Nitric oxide mediates neurodegeneration and breakdown of the blood-brain barrier in tPA-dependent excitotoxic injury in mice. ***J Cell Sci*** 119 (2006) 339-349.

[26] Salom JB, Orti M, Centeno JM, Torregrosa G, Alborch E, Reduction of infarct size by the NO donors sodium nitroprusside and spermine/NO after transient focal cerebral ischemia in rats. ***Brain Res*** 865 (2000) 149–156.

[27] Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. ***Stroke*** 28 (1997) 1283-1288.

[28] Sercombe R, Issertial O, Seylaz J, Pinard E, Effects of chronic L-NAME treatment on rat focal cerebral ischemia and cerebral vasoreactivity. ***Life Sci*** 69 (2001) 2203–2216.

[29] Shaw CM, Alvord EC Jr, Berry RG, swelling of the brain following ischemic infarction with arterial occlusion. ***Arch Neurol*** 1 (1959) 161-177.

[30] Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharp FR, A semiautomated method for measuring brain infarct volume. ***Cereb Blood Flow Metab*** 10 (1990) 290-293.

[31] Tan KH, Harrington S, Purcell WM, Hurst RD, Peroxynitrite Mediates Nitric Oxide–Induced Blood–Brain Barrier Damage. ***Neurochem Res*** 29 (2004) 579-587.

[32] Vakili A, Nekkoeian AA, Dehghani GA, L-NAME and 7-Nitorindazole reduces brain injuries in transient focal cerebral ischemia in the rat. ***Iran J Med Sci*** 29 (3) (2004) 109-115.

[33] Wolburg H , Noell S , Mack A , Wolburg-Buchholz K , Fallier-Becker P, Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. ***Cell Tiss Res*** 335 (2009) 75-96.

[34] Zhang F, Iadecola C, Nitroprusside improves blood flow and reduces brain damage after focal ischemia. ***Neuroreport*** 4 (1993) 559-562.