دوره ۲۴، شماره ۷۷، بهار ۱۴۰۰، صفحات: ۱۹-۱۱

مقاله پژوهشی

اثرات محافظتی لوتئولین در مدل ایسکمی مغزی رت

سجاد سحاب نگاه[۱،۲،۳]، محمد حسین سرفراز خباز [۲،۴]، جمیله غلامی[۵]، محمدامین خدادادگان [۶]، فاطمه فروزانفر[۱،۲*]

[۱] استادیار، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

[۲] گروه علوم اعصاب، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

[۳] مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفاء، بیمارستان خاتم الانبیاء، تهران، ایران

[۴] دانشجوی پزشکی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

[۵] کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

[۶] دانشجوی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۲۷ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۹/۱۰/۰۸

چکیده

مقدمه: نتایج مطالعات اخیر بیانگر اثرات حفاظتی لوتئولین در برابر التهاب و استرس اکسیداتیو هستند. در این راستا، مطالعه حاضر با هدف تعیین اثرات حفاظت لوتئولین بر نوروژنز (Neurogenesis) رفتار و حجم ضایعه در مدل سکته مغزی رت انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی از چهار گروه هشت نفری رت نر نژاد ویستار شامل: گروه‌های کنترل، شم و گروه‌های دریافت‌کننده لوتئولین با دوزهای ۱۵ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن متعاقب ایجاد ایسکمی مغزی فوکال استفاده شد. ۲۴ ساعت بعد حجم ناحیه ایسکمی، نتایج آزمون رفتاری روگر نوروژنز در گروه‌های آزمایشی بررسی گردید.

یافته‌ها: تجویز لوتئولین با دوزهای ۱۵ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن به صورت وابسته به دوز سبب کاهش سایز و بهبود آزمون رفتاری سکته شد. در این مطالعه بیان ژن‌های مربوط به نورون‌زایی از قبیل sox2، nestin و Dcx بررسی گردید و نشان داده شد که لوتئولین باعث تغییرات معنادار فاکتورهای نوروژنز نسبت به گروه کنترل نشده است.

نتیجه‌گیری: لوتئولین دارای پتانسیل قوی در حفاظت نورونی و پیشگیری از سکته مغزی است. نتایج این مطالعه می‌تواند در مطالعات بعدی در زمینه تشخیص اثرات حفاظت نورونی لوتئولین مفید باشد.

کلمات کلیدی: سکته مغزی، فلاونوئید، لوتئولین، نوروژنز

* **نویسنده مسئول:** فاطمه فروزانفر، گروه علوم اعصاب، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. تلفن: ۰۵۱۳۸۰۰۲۴۷۴؛ ایمیل: forouzanfarf@mums.ac.ir

مقدمه

سکته مغزی سومین علت مرگ و میر پس از بیماری‌های قلبی- عروقی و سرطان بوده و یکی از علت‌های عمده ناتوانی طولانی‌مدت و شدید می‌باشد. باید خاطرنشان ساخت که سالمندان بیشتر در معرض سکته مغزی قرار دارند. از سوی دیگر در کشورهای در حال توسعه نیز با تغییر شیوه زندگی، بروز سکته مغزی در حال افزایش می‌باشد (۱،۲). در آسیب ایسکمیک مغزی، سلول‌ها به گلوکز و اکسیژن مورد نیاز دسترسی ندارند که این مهم باعث اختلال هموستاز سلولی شده و وقایع سمیت تهییجی، اختلالات یونی، دپلاریزاسیون ناحیه اطراف آنفارکت، استرس اکسیداتیو و نیتراتیو، التهاب و آپوپتوز را به همراه دارد (۳،۴). با وجود میزان زیاد مرگ و میر، تاکنون تنها روش درمانی کارآمد، استفاده از پلاسمینوژن نوترکیب بافتی ترومبولیتیک می‌باشد که به دلیل محدودیت زمانی استفاده، کاربرد گسترده‌ای ندارد. نبود درمان دارویی قطعی، عوارض زیاد سکته مغزی و بار بیماری تحمیل شده بر جامعه، پژوهشگران را به سوی یافتن درمان‌های جدید سوق داده است. مواد مؤثره گیاهی ترکیبات شیمیایی فعال زیستی ناشی از گیاهان هستند که وظیفه اثرات دارویی گیاهان دارویی را بر عهده دارند (۵). در این میان، ترکیبات پلی فنولیک به ویژه فلاونوئیدها یکی از مؤثرترین کلاس‌های شیمیایی هستند که دارای طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های تحریک‌کننده سلامتی و اثرات دارویی مانند آنتی‌اکسیدان، ضد التهاب، ضد سرطان، محافظت‌کننده عصبی و اثرات قلبی محافظت می‌باشند (۶). لوتئولین فلاونوئیدی است که اثرات فارماکولوژیک گسترده‌ای شامل: آنتی‌اکسیدانت (۷)، آنتی آپوپتوز (۸) و ضد التهاب (۹) دارد. تجویز لوتئولین در مدل ایسکمی مغزی فوکال باعث بهبود نقایص نورولوژیکی حجم ضایعه گردیده و منجر به کاهش مارکرهای استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در مغز رت‌های دچار سکته مغزی می‌گردد (۸). با توجه به مطالب بیان شده، مطالعه حاضر با هدف تعیین اثرات حفاظت لوتئولین بر نوروژنز رفتار و حجم ضایعه در مدل سکته مغزی رت انجام شد.

مواد و روش‌ها

حیوانات و شرایط آزمایشگاهی

در این مطالعه تجربی از رت‌های نر بالغ ویستار با وزن ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم استفاده گردید. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی- تاریکی، دمای ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد و دسترسی کامل به آب و غذای استاندارد نگهداری شدند. تمامی آزمایشات مطابق با اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شدند.

حیوانات مورد مطالعه به صورت تصادفی در چهار گروه هشت نفری به شرح زیر تقسیم شدند:

۱) گروه اول یا شم که بدون ایجاد سکته مغزی تحت عمل جراحی قرار گرفتند و نرمال سالین را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

۲) گروه دوم یا سکته که سکته مغزی در آن‌ها ایجاد شد و پس از ریپرفیوژن، نرمال سالین را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

۳) گروه سوم یا درمان با دوز پایین که سکته مغزی در آن ها ایجاد شد و پس از ریپرفیوژن، لوتئولین با دوز ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

۴) گروه چهارم یا درمان با دوز بالا که سکته مغزی در آن‌ها ایجاد شد و در ادامه، آن‌ها لوتئولین با دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

روش جراحی به منظور ایجاد انسداد موقت در شریان مغزی میانی رت

بدین منظور از روش انسداد شریان میانی مغز (Longa،

۱۹۸۹) بدون باز کردن جمجمه با استفاده از مونوفیلامان استفاده گردید (۱۰). رت‌های نر نژاد ویستار با استفاده از ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن کلرال هیدرات بیهوش شدند. سپس برشی طولی به طول ۲ سانتی‌متر در خط میانی گردن حیوان ایجاد شد. پس از مشاهده شریان کاروتید، این شریان به آرامی از بافت‌ها و اعصاب اطراف جدا گردید. پس از جداسازی کاروتید مشترک، شریان به طور موقت به وسیله میکروکلیپس مسدود شد. در مرحله بعد، شریان کاروتید مشترک ادامه داده شد تا زمانی که محل دو شاخه شدن شریان مشاهده گردید. پس از شناسایی کاروتید خارجی و داخلی، کاروتید خارجی به وسیله نخ بخیه به طور دائمی مسدود گردید. کاروتید داخلی نیز به طور موقت به وسیله میکروکلیپس مسدود گشت. شایان ذکر است که نخ دیگری از زیر کاروتید خارجی عبور داده شد که در مرحله بعد به آن نیاز بود. سپس برشی کوچک روی کاروتید مشترک ایجاد گردید و مونوفیلامانی از جنس نایلون (نخ بخیه ۴-۰) که سر آن به وسیله حرارت گرد شده بود، به آرامی وارد شریان شد و با عبور از محل دو شاخه، وارد کاروتید داخلی گردید. پس از وارد کردن مونوفیلامان و عبور از محل دو شاخه، نخی که از زیر کاروتید خارجی از قبل عبور داده شده بود به طور موقت به منظور ممانعت از خونریزی بسته شد. پس از بستن نخ بخیه روی رگ، میکروکلیپسی که روی شریان داخلی قرار داشت، باز گردید تا مسیر برای عبور مونوفیلامان باز شود (۱۷/۵ میلی‌متر از محل دو شاخه شدن شریان باید وارد شود). پس از گذشت ۳۰ دقیقه به منظور برقراری مجدد جریان خون (۱۰،۱۱)، مونوفیلامان خارج گردید و نخ دومی که روی شریان کاروتید خارجی بسته شده بود به منظور جلوگیری از خونریزی محکم شد تا شریان به طور کامل مسدود گردد. پس از گذشت ۲۴ ساعت از برقراری مجدد جریان خون، بررسی عملکرد عصبی آزمون روگر انجام شد.

امتیازات آزمون روگر بر مبنای یک درجه‌بندی هشت مرحله‌ای در انسداد موقت شریان مغزی میانی راست بدین‌شرح است: بدون آسیب عصبی= صفر، ناتوانی در اکستانسیون کامل پنجه دست چپ= ۱، کاهش جمع کردن بازوی چپ هنگام کشیدن آهسته دم= ۲، حرکات ناخودآگاه در تمامی جهات، چرخش در جهت خلاف ضایعه فقط در اثر کشیدن دم= ۳، چرخش یا حرکت به سمت چپ= ۴، راه رفتن فقط در زمان تحریک= ۵، عدم پاسخ به تحریک با کاهش سطح هوشیاری= ۶ و مرگ= ۷ (۱۲).

اندازه‌گیری وسعت ضایعه با استفاده از روش TTC

در مدل‌های سکته مغزی ایسکمیک در حیوانات رنگ آمیزی TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) روش سریع و برای مشاهده منطقه دچار ایسکمی می‌باشد که اساس آن تشکیل رنگ قرمز ناشی از ایجاد فورمازون نامحلول در آب از TCC توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز در کمپارتمان‌های میتوکندریایی می‌باشد (۱۱). در این روش بافت سالم، قرمز رنگ و بافت دچار سکته، به رنگ سفید نمایان می‌شود (۱۳). رنگ‌آمیزی TCC پس از کشتن حیوان انجام شد. پودر TCC جهت تهیه محلول ۲ درصد در نرمال سالین حل گردید. تهیه برش از مغز، رنگ‌آمیزی و سپس عکس‌برداری و استفاده از Processing Tool انجام شد.

موارد مورد نظر با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

سطح سکته= سطح نیمکره سالم- سطح سالم نیمکره درگیر

بررسی مارکرهای نوروژنز با استفاده از qRT-PCR (Real-time polymerase chain reaction)

جهت استخراج RNA (Ribonucleic acid) از کیت Total RNA Extraction Kit (شرکت Parstous) استفاده

گردید. سپس غلظت RNA به روش دانسیته نوری (OD: Optical density) و میزان جذب (A260/A280) با استفاده از دستگاه اسپکتروفومتری اندازه‌گیری شد. در ادامه با استفاده از کیت Easy cDNA Synthesis Kit (شرکت Parstous) و با توجه به RNA به دست آمده، cDNA (Complementary Deoxyribonucleic acid) مطابق با پروتکل سنتز گردید. واکنش زنجیره‌ای RT-PCR برای ژن‌های Nestin، Dcx و Sox2 با استفاده از کیت SYBER Green qPCR Master Mix 2x (یکتا تجهیز آزما، ایران- شماره کاتالوگ YT2551) صورت گرفت (جدول ۱). پس از به دست آوردن C_T mean (میانگین C_T ژن‌ها)، معناداری یا عدم معناداری و مقایسه داده‌های به دست آمده از آزمون one way ANOVA با استفاده از نرم‌افزار Graph pad prism بررسی گردید و نمودار مربوط به هر ژن در مقایسه با ژن بتا-اکتین ترسیم شد.

روش‌های آماری

داده‌ها به وسیله نرم‌افزار GraphPad Prism آنالیز گردیده و به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها بین گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از آزمون آنالیز واریانس مقایسه گردید. (P<۰/۰۵) به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

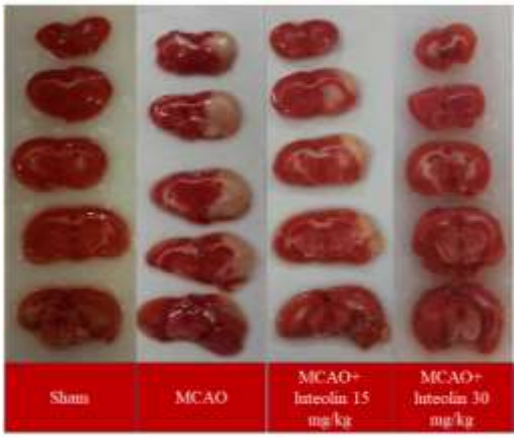
جدول ۱: توالی ژن‌های استفاده شده در مطالعه

Gene	Sequence (5′→3′)
Nestin	Forward: GTATGATGCCAAAGAAGCCAACAT Reverse: GGACTGGCTGTGTCTTGAACTC
Dcx	Forward: GCTGACCTGACTCGATCCTT Reverse: CCGACCAGTTGGGATTGACAT
Sox2	Forward: CCCACCTACAGCATGTCCTA Reverse: TGGAGTGGGAGGAAGAGGTA

نتایج

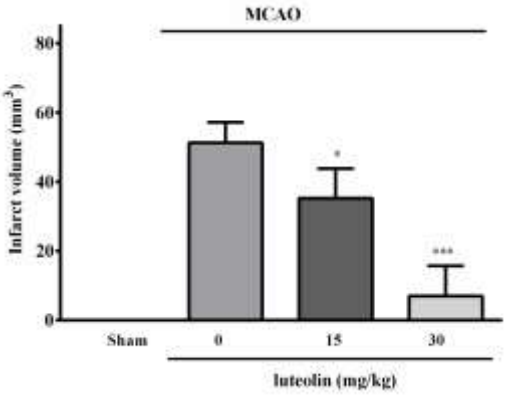
تأثیر لوتئولین بر حجم آنفارکت

پس از رنگ‌آمیزی، ناحیه آنفارکت به صورت ناحیه‌ای رنگ‌پریده و مناطق سالم مغز به صورت ناحیه قرمز مشخص شدند (شکل ۱).



شکل ۱: رنگ‌آمیزی بافت مغز با استفاده از TTC

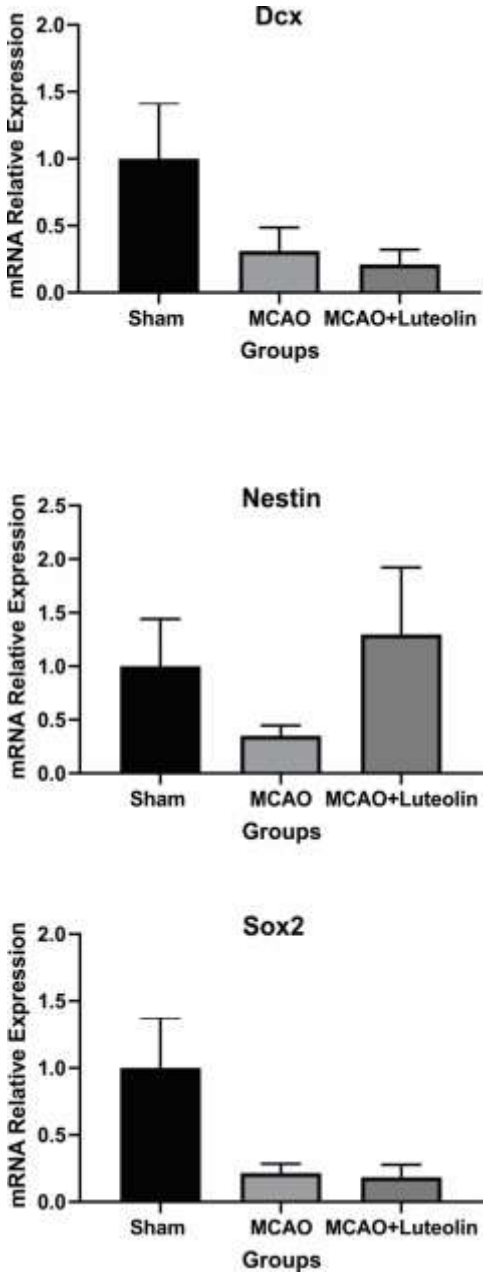
میانگین حجم آنفارکت در گروه ایسکمی مغزی برابر با ۶±۵۱/۲۵ میلی‌متر مکعب بود که این حجم به شکل قابل ملاحظه‌ای پس از تجویز لوتئولین به میزان ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم (۸/۵±۳۵/۲ میلی‌متر مکعب) و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (۸/۷±۷ میلی‌متر مکعب) کاهش پیدا کرد (به ترتیب P<۰/۰۵ و P<۰/۰۰۱) (شکل ۲).



شکل ۲: نمودار نشان‌دهنده کاهش معنادار حجم سکته در گروه‌های درمانی

بررسی اثر لوتئولین بر بیان مارکرهای نورون‌زایی

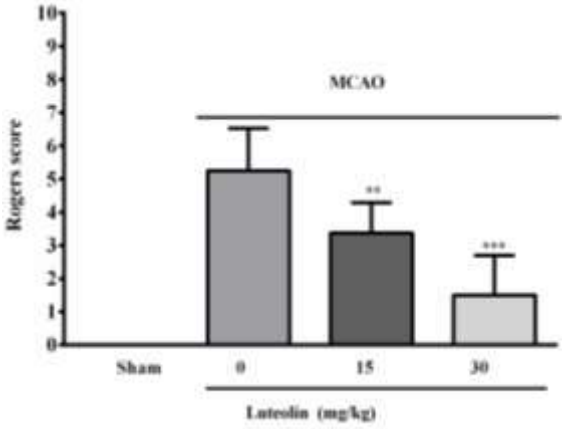
در این پژوهش میزان بیان سه ژن Nestin، Dcx و Sox2 با ژن کنترل بتا-اکتین مقایسه گردید. بررسی و مقایسه نتایج به دست آمده از آزمون Real Time PCR نشان داد که لوتئولین تأثیر معناداری بر بیان مارکرهای نورون‌زایی نسبت به گروه شم و سکته مغزی ندارد (شکل ۳).



شکل ۳: بیان مارکرهای نورون‌زایی sox2، Nestin و Dcx در گروه لوتئولین و کنترل

ارزیابی عملکرد عصبی

در آزمون روگر گروه شم، هیچ تغییری در نتیجه آزمون مشاهده نگردید (Roger score=۰). همان‌گونه که در شکل ۴ ملاحظه می‌شود، تجویز لوتئولین با دوزهای ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم (۳/۴±۰/۹) (P<۰/۰۱) و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (۱/۵±۱/۲) (P<۰/۰۰۱) به طور معنادار و وابسته به دوز، آسیب عصبی را نسبت به گروه سکته (۵/۲±۱/۳) کاهش داده است.



شکل ۴: نمودار نشان‌دهنده کاهش معنادار در اختلال عملکرد عصبی در گروه‌های درمانی

بحث

برای بررسی تأثیر داروها بر روند ایسکمی مغز، مدل حیوانی مناسب ضروری است. استفاده از مونوفیلامان برای القای ایسکمی در مدل MCAO یکی از روش‌های مورد استفاده برای این منظور است (۱۴). مدل MCAO به پاتوفیزیولوژی سکته مغزی ایسکمیک انسان شباهت دارد (۱۵). اختلال در هماهنگی حرکتی در مدل MCAO ایسکمی مغزی گزارش شده است (۱۶،۱۷).

نتایج بافت‌شناسی، شواهد مستقیمی را برای اندازه گیری میزان آسیب عصبی و همچنین محافظت از آن با استفاده از روش‌های درمانی ارائه می‌دهد (۱۸،۱۹). در مطالعه حاضر ایسکمی مغزی باعث بهبود عملکرد عصبی

شد. همچنین با استفاده از روش‌های رنگ‌آمیزی TTC، انفارکتوس مغزی قابل توجهی در گروه ایسکمیک آشکار گردید. این در حالی است که درمان با لوتئولین به طور معناداری باعث کاهش نواحی انفارک می‌شود. در شرایط ایسکمی، افزایش یون‌های کلسیم و سدیم و همچنین ADP (Adenosine-diphosphate) باعث ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن توسط میتوکندری می‌شود. از آنجایی که میزان آنتی‌اکسیدان‌ها در سلول‌های عصبی نسبتاً کم است، مغز نسبت به سایر ارگان‌ها، در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن بسیار آسیب‌پذیر می‌باشد (۲۰). افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن به ماکرومولکول‌های درون سلولی آسیب می‌زند که این مهم باعث ایجاد آپوپتوز سلولی می‌شود (۲۱،۲۲). شرایط ایسکمیک منجر به فعال شدن نیتریک اکسید سنتتاز (NOS: Nitric oxide synthase) و افزایش تولید نیتریک اکسید (NO) می‌شود. NO با سوپراکسید واکنش نشان داده و پروکسی نیترات که یک اکسیدانت بسیار قوی است، تولید می‌شود (۴). به دنبال ریپرفیوژن، تولید سوپراکسید، NO و پروکسی نیترات افزایش می‌یابد. تولید این رادیکال‌ها در مجاورت عروق، نقش مهمی در آسیب بافتی به دنبال ریپرفیوژن دارد. این رادیکال‌ها، متالوپروتئینازهای ماتریکس (MMP: Matrix metalloproteinase) را فعال می‌کند که این مهم باعث بر هم خوردن یکپارچگی دیواره عروقی و افزایش نفوذپذیری سد خونی مغزی می‌شود. علاوه‌براین، استرس اکسیداتیو و نیتراتیو باعث فراخوان نوتروفیل‌ها و سایر لکوسیت‌ها به عروق مغزی می‌شوند و سلول‌های التهابی با آزاد کردن آنزیم‌های خود موجب آسیب بیشتر غشای پایه و افزایش نفوذپذیری عروقی می‌گردند. این وقایع باعث خونریزی پارانشیم، ادم وازوژنیک و انفیلتراسیون نوتروفیلی در داخل مغز می‌شوند (۲۳). در این راستا، در مطالعه Qiao و همکاران نشان داده شد که تجویز لوتئولین باعث افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز و کاتالاز و از سوی دیگر کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود. پژوهشگران اثرات محافظت کنندگی عصبی آن را در مدل ایسکمی مغزی به دلیل افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌ها و به عبارت دیگر، کاهش استرس اکسیداتیو نسبت داده‌اند (۸). در مطالعات دیگر اثرات محافظت‌کننده عصبی لوتئولین نشان داده شده است. لوتئولین میزان تولید رادیکال‌های آزاد و مالون‌دی‌آلدهید را کاهش داده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی و همچنین میزان Nrf2 و HO-1 را در بافت عصبی رت‌های دیابتی افزایش می‌دهد (۲۴). علاوه‌براین، لوتئولین دارای محافظت عصبی در برابر مرگ سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو در سلول‌های نوروبلاستوما SH-SY5Y می‌باشد (۲۵). در مطالعه دیگری لوتئولین با کاهش استرس اکسیداتیو و مهار پاسخ‌های التهابی و آپوپتوز، اثر محافظت عصبی را به دنبال آسیب طناب نخاعی نشان داد. مکانیسم احتمالی ممکن است به فعال‌سازی Nrf2 و مهار مسیر التهاب NLRP3 مربوط باشد (۲۶). یکی از مواردی که امروزه در بحث ترمیم مغز پس از آسیب‌های مغزی به ویژه سکته‌های مغزی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است، افزایش نورون‌زایی در محل ضایعه می‌باشد (۲۷). نورون‌زایی می‌تواند باعث تسریع بهبود عملکرد مغز شود و از سوی دیگر جایگزین نورون‌های مرده گردد؛ از این رو بررسی خواص نوروپروتکتیوی داروها و عصاره‌های گیاهی از طریق تأثیر بر مارکرهای نورون‌زایی به عنوان یک مکانیسم پیشنهادی مطرح می‌شود (۲۸). در این مطالعه سه مارکر مربوط به نورون‌زایی از قبیل Nestin، sox2 و Dcx در محل ضایعه بررسی گردید. نتایج حاصل از این مطالعه نشان دادند که تفاوت معناداری در تغییر بیان مارکرهای نورون زایی پس از تجویز لوتئولین به صورت تک‌دوز وجود ندارد. عدم معناداری این مارکرها می‌تواند به دلیل زمان ارزیابی در این مطالعه باشد؛ از این رو بررسی تأثیر لوتئولین با

زمان بیشتر پس از سکته پیشنهاد می‌گردد.

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به بررسی تنها ۲۴ ساعت پس از ایجاد مدل ایسکمی مغزی و همچنین تجویز بلافاصله پس از ایجاد جراحی ایسکمی مغزی اشاره کرد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر خواص نوروپروتکتیو لوتئولین به دنبال آسیب ایسکمیک ریپرفیوژن بررسی گردید. نتایج نشان دادند که به دنبال تجویز لوتئولین به مدل‌های ایسکمی مغزی به صورت وابسته به دوز، بهبود عملکرد نورولوژیک و کاهش حجم ضایعه در بافت مغز ایجاد می‌شود.

حمایت مالی

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شده است.

ملاحظات اخلاقی

پژوهش حاضر برگرفته از پایان‌نامه پزشکی عمومی با طرح تحقیقاتی شماره ۹۷۱۴۰۱ بوده و از نظر ملاحظات اخلاقی در دانشگاه علوم پزشکی مشهد تصویب گردیده است.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تضاد منافعی در این مطالعه وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به دلیل حمایت مالی صورت‌گرفته از این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Ovbiagele B, Nguyen-Huynh MN. Stroke epidemiology: advancing our understanding of disease mechanism and therapy. Neurotherapeutics. 2011; 8(3):319.
2. Amarenco P, Kim JS, Labreuche J, Charles H, Abtan J, Béjot Y, et al. A comparison of two LDL cholesterol targets after ischemic stroke. N Engl J Med. 2020; 382(1):9-19.
3. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. Neuropharmacology. 2008; 55(3):310-8.
4. González RG. Acute ischemic stroke. Heidelberg, Germany: Springer Verlag GmbH; 2011.
5. Frank J, Fukagawa NK, Bilia AR, Johnson EJ, Kwon O, Prakash V, et al. Terms and nomenclature used for plant-derived components in nutrition and related research: efforts toward harmonization. Nutr Rev. 2020; 78(6):451-8.
6. Daglia M, Di Lorenzo A, Nabavi SF, Talas ZS, Nabavi SM. Polyphenols: well beyond the antioxidant capacity: gallic acid and related compounds as neuroprotective agents: you are what you eat! Curr Pharm Biotechnol. 2014; 15(4):362-72.
7. Ashokkumar P, Sudhandiran G. Protective role of luteolin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis. Biomed Pharmacother. 2008; 62(9):590-7.
8. Qiao H, Dong L, Zhang X, Zhu C, Zhang X, Wang L, et al. Protective effect of luteolin in experimental ischemic stroke: upregulated SOD1, CAT, Bcl-2 and claudin-5, down-regulated MDA and Bax expression. Neurochem Res. 2012; 37(9):2014-24.
9. Aziz N, Kim MY, Cho JY. Anti-inflammatory effects of luteolin: a review of in vitro, in vivo, and in silico studies. J Ethnopharmacol. 2018; 225:342-58.
10. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke. 1989; 20(1):84-91.
11. Carmichael ST. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. NeuroRx. 2005; 2(3): 396-409.
12. Gutiérrez-Fernández M, Rodríguez-Frutos B, Ramos-Cejudo J, Vallejo-Cremades MT, Fuentes B, Cerdán S, et al. Effects of intravenous administration of allogenic bone marrow-and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on functional recovery and brain repair markers in experimental ischemic stroke. Stem Cell Res Ther. 2013; 4(1):11.
13. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Adams RJ, Berry JD, Brown TM, et al. Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. Circulation. 2011; 123(4):e18-209.
14. Forouzanfar F, Hosseinzadeh H, Ebrahimzadeh Bideskan A, Sadeghnia HR. Aqueous and Ethanolic

Extracts of Boswellia serrata Protect Against Focal Cerebral Ischemia and Reperfusion Injury in Rats. Phytother Res.
15. 2016 ; 30(12): 1954-67. Ginsberg MD. The new language of cerebral ischemia. AJNR Am J Neuroradiol. 1997; 18(8):1435-45.
16. Ghazavi H, Hoseini SJ, Ebrahimzadeh-Bideskan A, Mashkani B, Mehri S, Ghorbani A, et al. Fibroblast growth factor type 1 (FGF1)-overexpressed adipose-derived mesenchaymal stem cells (AD-MSC FGF1) induce neuroprotection and functional recovery in a rat stroke model. Stem Cell Rev Rep. 2017; 13(5):670-85.
17. Sinha K, Chaudhary G, Gupta YK. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. Life Sci. 2002; 71(6):655-65.
18. Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. Pharmacol Biochem Behav. 2007; 87(1): 179-97.
19. Forouzanfar F, Hosseinzadeh H, Ebrahimzadeh Bideskan A, Sadeghnia HR. Aqueous and ethanolic extracts of boswellia serrata protect against focal cerebral ischemia and reperfusion injury in rats. Phytother Res. 2016; 30(12):1954-67.
20. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. 1993; 262(5134): 684-95.
21. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? Lancet. 1994; 344(8924):721-4.
22. Sugawara T, Chan PH. Reactive oxygen radicals and pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia. Antioxid Redox Signal. 2003; 5(5):597-607.
23. Crack PJ, Taylor JM. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. Free Radic Biol Med. 2005; 38(11):1433-44.
24. Li M, Li Q, Zhao Q, Zhang J, Lin J. Luteolin improves the impaired nerve functions in diabetic neuropathy: behavioral and biochemical evidences. Int J Clin Exp Pathol. 2015; 8(9):10112-20.
25. Kang SS, Lee JY, Choi YK, Kim GS, Han BH. Neuroprotective effects of flavones on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y neuroblostoma cells. Bioorg Med Chem Lett. 2004; 14(9):2261-4.
26. Fu J, Sun H, Zhang Y, Xu W, Wang C, Fang Y, et al. Neuroprotective effects of luteolin against spinal cord ischemia–reperfusion injury by attenuation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis. J Med Food. 2018; 21(1):13-20.
27. Lindvall O, Kokaia Z. Neurogenesis following stroke affecting the adult brain. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015; 7(11):a019034.
28. Xie F, Liu H, Liu Y. Adult neurogenesis following ischaemic stroke and implications for cell-based therapeutic approaches. World Neurosurg. 2020; 138:474-80.

Volume 24, Issue 77, Spring 2021, Pages: 11-19

Original Article

Protective Effects of Luteolin in a Rat Model of Ischemic Stroke

Sajad Sahab Negah[1, 2,3], Mohammad Hossien Sarfaraz[4,2], Jamileh Gholami[5], Mohammad Amin Khodadadegan[6], Fatemeh Forouzanfar[1,2*]

1. Assistant Professor, Neuroscience Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
2. Department of Neuroscience, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
3. Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Alanbia Hospital, Tehran, Iran.
4. Medical student, Neuroscience Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
5. MSc, Neuroscience Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
6. Medical student, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Received: 17 November 2020 **Accepted:** 28 December 2020

Abstract

Introduction: Recent studies have pointed to the protective effects of luteolin against inflammation and oxidative stress. The present study aimed to investigate the protective effect of luteolin on neurogenesis, behavioral deficits, and infarct volume in a rat model of ischemia stroke.

Materials and Methods: The present experimental study was conducted on eight rats in four groups of sham, control, and two treatments. The treatment groups received luteolin (15 or 30 mg/kg body weight) following focal cerebral ischemia. To assess the efficacy of luteolin, some stroke pathological changes, such as infarct volume, roger behavioral test, and neurogenesis were evaluated after 24 h.

Results: Administration of luteolin at doses of 15 and 30 mg/kg body weight reduced the infarct volume and improved the behavioral test after stroke in a dose-dependent manner. In the present study, the mRNA expression of neurogenesis markers, such as sox2, Nestin, and Dcx was investigated. The results showed that luteolin did not exert any significant effects on neurogenesis markers.

Conclusion: As evidenced by the obtained results, luteolin has a strong potential in the prevention/neuroprotection of ischemia stroke. Further studies are needed to clearly define the neuroprotective effects of luteolin.

Keywords: Flavonoid, Ischemia stroke, Luteolin, Neurogenesis

* ***Corresponding Author:*** Fatemeh Forouzanfar, Department of Neuroscience, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. Tel: 05138002474; Email: forouzanfarf@mums.ac.ir