

بررسی اثر اولتراسوند بر میزان محافظت از پیوستگی سد خونی- مغزی در مدل امبولیک سخته مغزی

چکیده

زمینه و هدف: اولتراسوند (US) جهت کاهش زمان باز شدن عروق موجب افزایش عملکرد درمان با عوامل نوروپروتکتیو و همچنین به علت اثرات تقویتی US بر فعالیت فیبرینولیتیک می‌باشد. در این مطالعه اثر درمانی فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی به‌طور توأم در مدل ترومبوآمبولیک سخته مغزی به‌کارگرفته و اثرات US به تنهایی یا همراه با عوامل ترومبولیتیک (فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی) در شرایط نورموترمی بر میزان پیوستگی سد خونی- مغزی (BBB) بررسی شد. **روش بررسی:** حیواناتی که در این آزمایش به‌کار رفته‌اند موش‌های رت نر با محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم بودند در این مطالعه دو سری آزمایش انجام گرفت در مطالعه اول، اثرات US بر تغییرات اختلال خون‌رسانی با یا بدون tPA در مغز دچار ایسکمی بررسی گردید. حیوانات به‌طور تصادفی به چهار گروه (هفت رت در هر گروه) ۱- کنترل ۲-US-۳ high-tPA+US و ۴-high tPA تقسیم گردیدند در گروه کنترل، نرمال سالین (۰/۹٪) و در گروه US، اولتراسوند در فرکانس یک مگاهرتز و شدت 1 W/cm^2 و ۱ duty cycle ۱۰ درصد در گروه high-tPA+US، اولتراسوند در فرکانس یک مگاهرتز و شدت 1 W/cm^2 و ۱ duty cycle ۱۰ درصد به همراه tPA با دوز 20 mg/kg داخل وریدی، در گروه high tPA، دوز پایین 20 mg/kg داخل وریدی، به حیوانات تجویز گردید. در مطالعه دوم، اثرات US بر میزان نفوذپذیری BBB با یا بدون tPA در مغز دچار ایسکمی بررسی گردید. حیوانات به‌طور تصادفی به چهار گروه (n=7 در هر گروه) ۱- کنترل ۲-US-۳ high-tPA+US و ۴-high-tPA همانند گروه‌های مشابه در مطالعه اول تقسیم گردیدند. در این دو آزمایش، US در شرایط نورموترمی جهت آزمون نوع اثر بر محافظت از پیوستگی BBB و اختلالات پرفیوژن بررسی شد. **یافته‌ها:** US به‌تنهایی می‌تواند سبب کاهش اختلالات خون‌رسانی شده همچنین به‌طور معنی‌داری میزان نفوذپذیری BBB را که با میزان نشت اوانس‌بلو اندازه‌گیری شده، کاهش می‌دهد. اختلالات حرکتی نورولوژیک و فعالیت تشنجی توسط تست‌های رفتاری اندازه‌گیری گردید. **نتیجه‌گیری:** US بر ایجاد اثرات مفید در مدل امبولیک سخته مغزی در رت مؤثر بوده و اختلال خون‌رسانی در مغز با آسیب ایسکمیک را بهبود می‌بخشد.

کلمات کلیدی: استروک، اولتراسوند، فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی

صادق صیدی^۱

علیرضا شعبان زاده^{۲*}

مصطفی محقق^۳

مجید غفاریور^۲

اشفق شوئیپ^۴

۱- گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- مرکز تحقیقات بیماریهای اعصاب ایران، مرکز تحقیقات و بانک فرآورده‌های پیوندی ایران

۳- دانشگاه علوم پزشکی تهران

۴- مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه آلبرتا

*نویسنده مسئول: نشانی: دانشگاه علوم پزشکی تهران - مرکز تحقیقات بیماری‌های اعصاب ایران تلفن: ۶۶۲۸۲۸۸ email: shaebanz@sina.tums.ac.ir

مقدمه

یک شریان است و البته این مدل‌ها جهت مطالعه پاتوفیزیولوژی انفارکتوس ایسکمیک که به واسطه عوامل ایجاد کننده ترمبوس ایجاد شده است، مناسب نمی‌باشند.^۴ ما از یک مدل آمبولی بهبود یافته استفاده می‌کنیم که شریان مغزی میانی (MCA) را به واسطه تزریق لخته از پیش آمده شده، مسدود می‌کند.^۵ ایسکمی سبب آسیب نوروها و آثار دیگر نورودژنراتیو می‌گردد^۶ که در موش‌هایی که دچار انسداد MCA شده‌اند اختلالات نورولوژیک معنی‌داری از قبیل اختلالات وضعیتی و فلج نیمه بدن در ۲۴ ساعت پس از عمل

سخته مغزی یکی از عوامل اصلی مرگ و میر و معلولیت‌ها در دنیا است که سالانه بیش از ۵۰۰۰۰۰ نفر در آمریکا به آن دچار می‌گردند.^۱ ۸۰-۹۰٪ سخته مغزی دچار شده‌اند، به علت ترومبوآمبولی بوده است^۲ و اکثریت گونه‌های مختلف ایسکمیک در اثر انسداد شریان مغزی میانی (MCA) و شاخه‌های آن می‌باشد.^۳ غالب مدل‌های ایسکمیک عمومی و موضعی که در نهایت در تحقیقات Stroke استفاده می‌شود به‌واسطه انسداد با جراحی یا قراردادن یک فیلامنت درون

پائین (کمتر یا مساوی یک مگاهرتز) و نفوذ بهتر در استخوان جمجمه درمقایسه با فرکانس بالا می‌باشد.^{۲۸-۳۳}

روش بررسی

حیواناتی که در این آزمایش بکار رفته‌اند موش‌های رت نر با محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم بودند. در این پژوهش از پروتکل‌های مربوط به نگهداری حیوان و به کارگیری آن در کارهای پژوهشی در استفاده شده است. این پژوهش شامل دو مطالعه به شرح زیر می‌باشد: در این مطالعه اول، اثرات US بر تغییرات اختلال خون‌رسانی (perfusion deficits) با یا بدون tPA در مغز دچار ایسکمی بررسی گردید. حیوانات به‌طور تصادفی به چهار گروه (هفت رت در هر گروه) ۱- کنترل ۲-US ۳-US -tPA+ high و ۴-tPA high تقسیم گردیدند. در گروه کنترل، نرمال سالین (۰/۹٪) و در گروه US، اولتراسوند در فرکانس یک مگاهرتز و شدت 1 W/cm^2 و duty cycle ۱۰ درصد در گروه high-tPA+US، اولتراسوند در فرکانس یک مگاهرتز و شدت 1 W/cm^2 و duty cycle ۱۰ درصد به همراه tPA با دوز 20 mg/kg داخل وریدی، به حیوانات تجویز گردید. اختلال خون‌رسانی هشت ساعت پس از انسداد MCA اندازه‌گیری گردید.

در مطالعه دوم، اثرات US بر میزان نفوذپذیری BBB با یا بدون tPA در مغز دچار ایسکمی بررسی گردید. حیوانات به‌طور تصادفی به چهار گروه (n=7 در هر گروه) ۱- کنترل ۲-US ۳-US -tPA+ high و ۴-tPA high همانند گروه‌های مشابه در مطالعه اول تقسیم گردیدند. نفوذپذیری سد خونی مغزی توسط میزان نشست Evans (EB) Blue از عروق مذکور هشت ساعت پس از انسداد MCA اندازه‌گیری گردید. تمامی داروها به‌صورت داخل وریدی تزریق گردیدند و حیوانات ۴۸ ساعت پس از انسداد MCA گردن زده شدند. در مدل ایسکمی موضعی مغزی، ایسکمی موضعی مغزی یک طرفه در مغز توسط تزریق لخته خون از پیش آماده شده به داخل MCA که در مقالات قبلی چاپ گردیده است ایجاد گردید.^{۳۴} به‌طور خلاصه، در ابتدا، حیوانات توسط فوران ۳ درصد بیهوش گردیده و این بیهوشی توسط فوران ۱/۵ درصد با ترکیبی از گازهای O_2 و NO_2 در حین جراحی ادامه یافت. دمای مغز حیوان در حین جراحی $39^{\circ}\text{C} \pm$ ثابت نگه داشته می‌شد. یک شکاف طولی به اندازه دو سانتیمتر در

جراحی قابل مشاهده است.^۷ در اواسط دهه ۱۹۷۰ Trubestein و همکاران قدرت اولتراسوند (US) را در القاء فیبرینولیز نمایش دادند. در کارهای آغازین US را بدون استفاده از داروهای ترومبولیتیک به کار بردند.^۸ پیشرفت در به کارگیری US و کاتترهای اولتراسونیک در القاء فیبرینولیز به تدریج در دهه ۱۹۸۰ تحقق یافت.^{۹-۱۲} به هر حال دستاوردهای دارویی فیبرینولیتیک، روند به کارگیری US را در این زمینه تحت تاثیر قرار داده و استفاده مجدد از US جهت فیبرینولیز بدون داروهای ترومبولیتیک امروزه مورد توجه قرار گرفته است. در دهه ۱۹۸۰ این حالت به‌صورت تهاجمی بود.^{۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶} ولی امروزه US به‌صورت غیر تهاجمی بکار گرفته می‌شود و اثرات فیبرینولیتیک آن بدون حضور داروها چه در حالت in vivo و حالت IN VITRO نشان داده شده است.^{۱۴-۱۶} پیشرفت‌های متعاقب این نتایج روی دو محدوده درمانی با فرکانس‌های پایین (کیلوهرتز) ۲۱-۲۳ و فرکانس‌های بالا (مگاهرتز) ۱۷-۲۰ تمرکز گردیده است. از US در درمان انسدادی عروق قلب^{۲۴، ۲۵} و همچنین در درمان انسدادی عروق مغز^{۲۶، ۲۷} در بالین استفاده شده است و یافته‌های پژوهشی نشان می‌دهد که امواج US تحریک آنزیم‌های فیبرینولیز را سرعت می‌بخشد. فاکتورهای متفاوتی بر آسیب‌های مغزی و یافته‌های بالینی پس از انسداد شریان مغزی تاثیر می‌گذارد. در این میان زمان باز شدن عروق از مهمترین فاکتورها می‌باشد. باز شدن خودبخودی شریانها و شاخه‌های وابسته به آن در حدود ۲۰ درصد از بیماران اتفاق می‌افتد. درحالی که تزریق و به‌کارگیری عوامل ترومبولیتیک که دارای محدودیت‌های اندکی می‌باشند می‌توانند بازگشایی عروق را به میزان ۴۷-۳۴ درصد در طی ۲۴ ساعت افزایش دهد. این بازگشایی می‌تواند تا میزان ۷۵ درصد حاصل شود به شرط آن که داخل شریانی تزریق ترومبولیکی را داشته باشیم. از آنجا که این فرایند به‌طور بسیار اختصاصی باید در مراکز استروک انجام پذیرد محدودیت‌های فراوانی را شامل می‌شود. بنابراین تلاش بر آن انجام می‌گردد تا با به کارگیری همزمان عوامل ترومبولیتیک میزان تجزیه لخته خون افزایش یابد. امواج US با فرکانس پائین، بین ۲۰ کیلوهرتز و یک مگاهرتز با شدت‌های متفاوت، از یک تا 25 W/cm^2 اثرات It-PA بازگشایی عروق محیطی را افزایش می‌دهند. مکانیسم اثر US از طریق تقویت فعال‌سازی آنزیم‌های فیبرینولیز و افزایش سرعت انتقال It-PA به داخل لخته خون می‌باشد، اثرات US باعث تقویت ترومبولیز با محدوده فرکانس

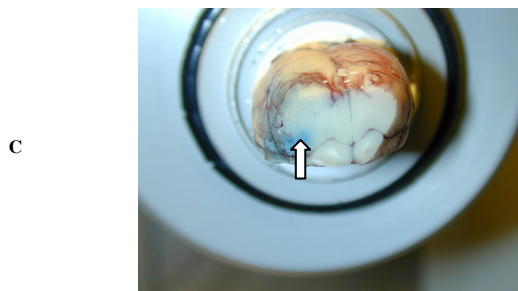
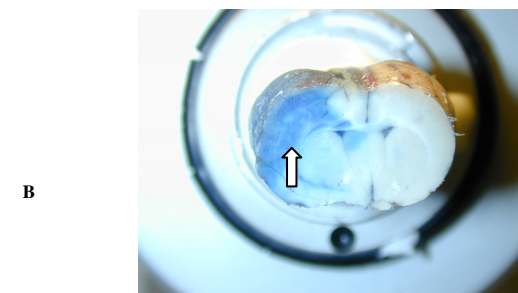
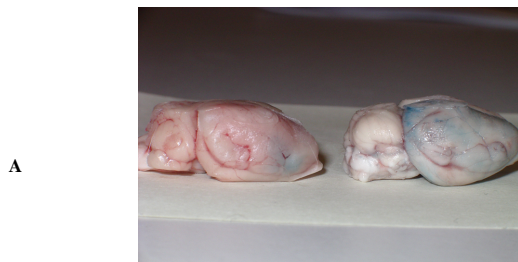
بلو را اندازه‌گیری می‌کند ارزیابی می‌گردد.^{۳۸} به‌طور خلاصه، اوانس بلو دو درصد در محلول سالین به میزان ۰/۲ میلی‌لیتر به ازاء هر ۱۰۰ گرم از وزن حیوان به‌طور داخل وریدی و هشت ساعت پس از تزریق لخته به MCA انجام می‌گردد. در این فرایند ۱۵ دقیقه زمان برای به گردش درآمدن اوانس بلو در جریان خون مورد نیاز می‌باشد. حیوانات پس از این مرحله از بطن چپ، به‌طور داخل قلبی، در معرض انفوزیون سالین قرار گرفته و با ایجاد یک منفذ در دهلیز راست میزان شفافیت خون خارج شده را بررسی می‌کنیم این تزریق تا زمانی ادامه می‌یابد که مایع خارج شده از دهلیز راست فاقد رنگ و شفاف باشد. سپس با کشتن حیوان مغز را در نواحی استریاتوم و قشر اطراف آن جدا کرده و توسط امواج فراصوت هوموژنیز می‌نماییم. میزان غلظت اوانس بلو توسط یک اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۰ نانومتر در مقایسه با منحنی استاندارد تعیین می‌گردد. میزان اوانس بلو که از عروق مغزی نشت کرده است تحت عنوان اندکس نشتی اوانس بلو مورد بررسی قرار می‌گیرد. این اندکس میزان نشت اوانس بلو را در هر گروه به‌طور مقایسه نسبی با گروههای کنترل و هیپوترمی نشان می‌دهد و به صورت کسری از شدت جذب در هر گروه نسبت به گروه کنترل بیان می‌شود. حجم انفارکتوس، ادم، اختلال خون‌رسانی و نشت سد خونی مغزی با آزمون ANOVA یک طرفه و آزمون متعاقب Tukey بررسی و اختلال رفتار با آزمون‌های Kruskal-Wallis و Wilcoxon Signed Ranks Test آنالیز و بر حسب interquartale range بیان گردید. $p < 0/05$ از نظر آماری معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها

مطالعه ۱: اختلالات خون‌رسانی در هشت ساعت پس از آمبولیزاسیون در شکل ۱ نشان داده شده است. در گروه‌های کنترل، $US+hightPA$ و $higtPA$ اختلال خون‌رسانی به صورت $mean \pm SD$ به ترتیب برابر با $14/32 \pm 3/15$ ، $7/03 \pm 4/08$ و $5/92 \pm 1/90$ می‌باشند. در گروه کنترل که با US اولتراسوند درمان شده بود این میزان برابر با $9/14 \pm 3/37$ mm^2 که به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود ($p < 0/05$). مطالعه ۲: در این مطالعه میزان نشت اوانس بلو پس از آسیب مغزی در حضور US به تنهایی و یا به همراه tPA در شرایط نورموترمی جهت بررسی میزان به هم پیوستگی BBB در مدل ترومبوآمبولیک مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان نشت اوانس بلو در هر

راستای خط میانی مهره گردنی بر روی پوست ایجاد گردید. بخش انتهایی شریان کاروتید خارجی راست (ECA) مسدود شده و نهایتاً قطع گردید. یک کاتتر پلی‌اتیلن از نوع PE-۱۰، که توسط ترومبین گاوی پر شده بود به داخل لومن ECA راست از طریق یک منفذ کوچک فرستاده شد. ۱۰ میکرولیتر خون کشیده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در کاتتر باقی ماند تا فرایند تشکیل لخته خون کامل گردد. هنگامی که لخته تشکیل گردید کاتتر دیگری به اندازه ۱۷ میلی‌متر به داخل شریان کاروتید داخلی (ICA) فرستاده شد به‌طوری که تقریباً نوک کاتتر در فاصله یک میلی‌متری منشأ MCA قرار گیرد. سپس لخته موجود در کاتتر تزریق گردید و پس از خارج‌سازی کاتتر و منافذ نیز به‌وسیله نخ جراحی مسدود شد و حیوان پس از طی سه ساعت شرایط هیپوترمی به داخل قفس فرستاده شد. در آزمایشات قبلی تفاوت معنی‌داری در تغییرات دینامیک در مدل انسداد عروقی آمبولیک مشاهده نگردید.^{۳۵} ارزیابی اختلالات حرکتی نورولوژیک و فعالیت تشنجی: این اختلالات و فعالیت‌های تشنجی در زمان‌های ۳، ۲۴ و ۴۸ ساعت در مطالعه دوم پس از تزریق لخته به داخل MCA مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت ارزیابی از سیستم امتیازدهی بدرسون و^{۳۶} راسین^{۳۷} استفاده گردید. مدل راسین به عنوان یک روش کمی کردن رفتارهای تشنجی به شرح ذیل می‌باشد در این روش امتیازها بین صفر تا پنج مشخص شده‌اند. (صفر) هیچ تشنجی مشاهده نشود، (۱) حرکت ریتمیک دهان و صورت، (۲) تکان دادن ریتمیک سر، کلونوس اندام جلویی، (۳) بلند شدن روی پا و کلونوس دو طرفه اندام جلویی، (۴) بلند شدن روی پا و افتادن. اندازه‌گیری اختلال خون‌رسانی مغز: روش اندازه‌گیری اختلال خون‌رسانی قبلاً^{۳۹} توضیح داده شده است. هشت ساعت پس از آمبولیزاسیون، حیوانات بیهوش شده و محلول دو درصد اوانس بلو، ۱۰-۱۰۰ گرم. ۰/۲ ml وزن بدن، به داخل ورید جوگولار راست تزریق شد و مدت ۱۰ ثانیه در خون گردش یافت. متعاقباً مغز حیوانها جدا گردید و توسط کرایواستات برشهایی به فاصله یک میلی‌متر و به‌طور ۹ برش متوالی با نقطه آغاز ۳/۷ میلی‌متر قدام برگما تهیه گردید. این که نواحی قشری و زیر قشری جهت ارزیابی اختلالات خون‌رسانی توسط میکروسکوپ فلورسنت ارزیابی شد و بر حسب میلی‌متر مربع گزارش گردید. اندازه‌گیری میزان نشت سد خونی مغزی: میزان نشت سد خونی مغزی توسط روش میکروپلیت الیزا که میزان نشت اوانس

کنترل و یک رت از هر یک از گروه‌های US، low tPA، US+low tPA، tPA، مشاهده گردید. ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آمبولیزاسیون، فعالیت

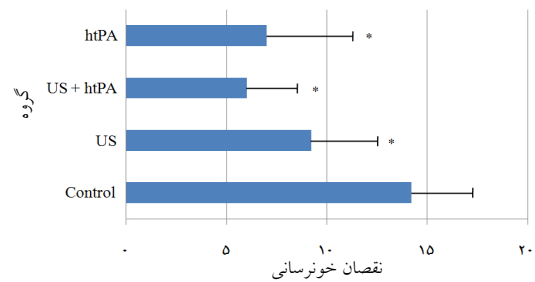


شکل-۳: تصویر نشئت BBB اوانس بلو در مغز دچار آسیب ایسکمی، (A,B,C)، A: مقایسه کل مغز دو رت کنترل و US+ tPA. B: نمایش مقطع عرضی نمونه US+ tPA. C: نمایش مقطع عرضی نمونه کنترل.

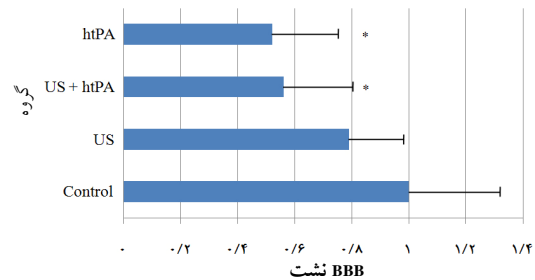
تشنجی در یک رت از هر یک از گروه‌های آزمایش مشاهده شد. فعالیت تشنجی در گروه‌هایی که US+high tPA یا high tPA دریافت کرده بودند مشاهده نگردید. میزان وقوع تشنج در زمان‌های سه، ۲۴ یا ۴۸ ساعت پس از انسداد MCA بین گروه‌های کنترل و سایر گروه‌های دیگر تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید.

بحث

دیر زمانی نیست که Zhang روش آسیب ایسکمی را به‌واسطه قراردادن یک میکروکاتتر درون ICA در منطقه که بلافاصله به MCA منتهی می‌شود به‌طور معنی‌داری بهبود داد.^{۴۰} درمدل آنها ایسکمی



شکل-۱: اثر US در اختلال خون‌رسانی هشت ساعت پس از انسداد شریان میانی مغز رت. (mean±SD). * تفاوت با گروه کنترل معنی‌دار می‌باشد. (p < 0.05). (n=7 در هر گروه)



شکل-۲: نسبت نشئت اوانس بلو در سد خونی-مغزی به گروه کنترل که به صورت اندکس نمایش داده شده است. * تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل، (p < 0.05). در هر گروه n=7

htPA= high tissue plasminogen activator
US= Ultra Sound
EB= Evans Blue

گروه نسبت به کسری از گروه کنترل و برحسب اندکس نشئت عروقی اوانس بلو بیان گردید (شکل‌های ۳ و ۲). US در ترکیب بافتی هموزن دو بخش قشر مغز و استریاتوم مغز مبتلا به آسیب ایسکمی با شرایط نورموترمی میزان نشئت اوانس بلو برخلاف tPA کاهش نداده است. در این مطالعه تفاوت معنی‌داری از نظر نشئت اوانس بلو در گروه‌های دریافت کننده همزمان US و tPA مشاهده (p < 0.05) و تغییرات اختلالات حرکتی نورولوژیک طی ۳، ۲۴ و ۴۸ ساعت در گروه‌های متفاوت در جدول ۱ نشان داده می‌شود. سه ساعت پس از آمبولیزاسیون، تمامی حیوانات اختلال حرکتی معنی‌داری را نشان داده‌اند این اختلال با میانه سه برای گروه‌های کنترل، US، low tPA، US+low tPA، US+high tPA و high tPA بیان شده است. در ساعت ۲۴ پس از آمبولیزاسیون، میانه اختلالات مشاهده شده در گروه‌های US+high tPA و US+low tPA نسبت به گروه کنترل بهبود یافته است (p < 0.05). ۴۸ ساعت پس از آمبولیزاسیون، اختلالات نورولوژیک نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد (p < 0.05). سه ساعت پس از انسداد MCA، فعالیت تشنجی در دو رت از گروه

می‌رسد که عروق بسیار ریز از فشار خارجی کلاپس‌کننده رها شده و بدین وسیله احیای جریان خون مغزی را در منطقه مبتلا به ایسکمی تسهیل می‌نماید. برای آزمون این فرضیه تغییرات دینامیک در اختلال خون‌رسانی بین گروه‌های درمان شده با US در شرایط نورموترمی به‌طور مقایسه‌ای انجام شد. نتایج نشان داد که US به‌طور معنی‌داری اختلال خون‌رسانی را کاهش می‌دهد. این نتایج که اثرات محافظتی US را در خصوص تجدید جریان خون مغزی نشان می‌دهد تایید اثرات محافظتی US در شرایط نورموترمی می‌باشد. مکانیسم‌های متعددی جهت بیان نحوه عمل کرد US در مورد مدل ترمبوآمبولیک سکنه مغزی در شرایط نورموترمی وجود دارد که عبارتند از: ۱- US با فرکانس پایین سبب گسستن اریتروسیت‌های داخل لخته خون می‌شود که منجر به فیبرینولیز می‌گردد.^{۴۴} این گسست در هنگام به‌کارگیری US با فرکانس بالا در خون لخته نشده نیز نشان داده شده است.^{۴۵} همچنین از بین رفتن اریتروسیت‌ها در اثر رهایی Hb، اثرات فیبرینولیتیک امواج US را افزایش داد. ۲- فعال‌سازی پلاکت وابسته به شدت و فرکانس US می‌باشد که این اثر در شدت‌های پایین US (0.7 w/cm^2) مشاهده نمی‌شود.^{۴۶-۴۷} فعال‌سازی پلاکت‌ها می‌تواند اثرات فیبرینولیتیک داشته و باعث فشرده شدن بیشتر لخته‌های خونی می‌گردد. ۳- اثرات فیبرینولیتیک US در فرکانس‌های پایین و بالا، نسبت به دارو اختصاصی نبوده^{۴۸} و اندازه مشتقات یا تولیدات دیگر پلاسمایی را تغییر نمی‌دهند^{۴۹} و باعث گسیخته شدن لخته نمی‌شوند.^{۵۰} ولی تصور می‌شود که اثرات تجمعی امواج US موجب افزایش انتقال عوامل لیتیک به داخل لخته‌ها شده و متعاقب آن جریان را در ترومبوس افزایش دهد،^{۵۱} همچنین باعث می‌شود که فیبرهای فیبرین پراکنده شده و به فیبرهای کوچکتر تبدیل گردند^{۴۸، ۱۶} و باعث تغییر در تمایل دارو به جایگاه‌های اتصال و نهایتاً افزایش اتصال و اثر دارو می‌گردد.^{۵۲، ۵۳} این مطالعه پیشنهاد می‌کند که امواج US به‌عنوان یک عامل محافظتی در مغز آسیب دیده ایسکمیک در مدل ترومبوآمبولیک در رت می‌تواند موثر باشد و ممکن است مکانیسم آن از طریق کاهش اختلال خون‌رسانی باشد.

References

1. Chuang DM, Chen RW, Chalecka-Franaszek E, Ren M, Hashimoto R, Senatorov V, et al. Neuroprotective effects of lithium in cultured cells and animal models of diseases. *Bipolar Disord* 2002; 4: 129-36
2. Mohr JP, Caplan LR, Melski JW, Goldstein RJ, Duncan GW, Kistler JP. The Harvard Cooperative Stroke Registry: a prospective registry. *Neurology* 1978; 28: 754-62.

مغزی کانونی به‌واسطه تزریق ۳۰ الی ۸۰ واحد از ترومبین به درون MCA حاصل می‌شود. وضوحاً مدل ترمبوآمبولیک MCA منجر به درک بهتر تغییرات پاتوفیزیولوژیک فعالیت‌های مغز در پاسخ به ایسکمی در انسان می‌گردد زیرا اپیزودهای اصلی ایسکمی در اثر انسداد MCA و شاخه‌های آن حاصل می‌گردند.^۴ راحتی و سهولت مدل آمبولیک گسترش آن را سبب شده است و در قیاس با سایر مدل‌های پیشین در رت مزیت‌های ذیل را دارد. روند جراحی در این مدل آسان گردید، این مدل وابستگی و شباهت بسیاری به موقعیت‌های حقیقی انسان دارد، مکانیسم‌های درمانی و حفاظتی متنوع می‌توانند به‌واسطه این مدل فراهم گردند.^{۴۱} در این مطالعه رت‌هایی که مورد انسداد MCA واقع شده‌اند نقص‌های نورولوژیک معنی‌داری در ۲۴ ساعت پس از القای انفارکتوس نشان داده‌اند و این آسیب در کورتکس مغز در منطقه حسی حرکتی پیشانی و مناطق گیجگاهی و در سگمنت خارجی هسته دم‌دار مشاهده می‌شود.^۷ اثر تقویتی US بر عمل داروهای ترومبولیتیک یکسان نمی‌باشد و همانند سایر ویژگی‌های درمانی US می‌باشد. Harrison نشان داده‌اند که US به میزان سیتوتوکسیتی عوامل شیمی درمانی را افزایش می‌دهند.^{۴۲} قبلاً گزارش گردیده بود که US می‌تواند اختلالات متعاقب مدل آمبولیک سکنه مغزی را کاهش دهد.^{۴۳} اثر درمانی tPA بر بهبود عوارض مدل ایسکمی مغزی در شرایط نورموترمی و هیپوترمی مؤثر است،^{۴۹} نتایج این مطالعه نشان داد که US می‌تواند اثرات درمانی tPA را افزایش دهد زیرا به کارگیری توأم US و tPA میزان عوارض ایسکمی را در مقایسه با به کارگیری هر کدام به تنهایی کاهش داده است. در مطالعه حاضر اثرات درمانی US را در مدل حیوانی و تحت شرایط نورموترمی انجام دادیم. نتایج نشان داد که به‌کارگیری US در رت‌ها در شرایط نورموترمی دارای اثرات محافظتی است. کاهش حجم انفارکتوس و اختلال خون‌رسانی مغزی در هر دو گروه US و US-tPA مشاهده گردید. به‌کارگیری US همچنین زمان بهبود اختلال حرکتی را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. US از بدتر شدن اختلالات متعاقب سکنه مغزی جلوگیری می‌نماید. در روند بهبود، به‌نظر

3. Brust JC. Cerebral circulation: stroke. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Principles of Neural Science. 3rd ed. Norwalk: Appleton & Lance 1991; p. 1041-9.
4. Wang CX, Yang T, Shuaib A. An improved version of embolic model of brain ischemic injury in the rat. *J Neurosci Methods* 2001; 109: 147-51.
5. Manji HK, Drevets WC, Charney DS. The cellular neurobiology of depression. *Nat Med* 2001; 7: 541-7.
6. Wei H, Qin ZH, Senatorov VV, Wei W, Wang Y, Qian Y, et al. Lithium suppresses excitotoxicity-induced striatal lesions in a rat model of Huntington's disease. *Neuroscience* 2001; 106: 603-12.
7. Nonaka S, Chuang DM. Neuroprotective effects of chronic lithium on focal cerebral ischemia in rats. *Neuroreport* 1998; 9: 2081-4.
8. Trübstein G, Engel C, Etzel F, Sobbe A, Cremer H, Stumpff U. Thrombolysis by ultrasound. *Clin Sci Mol Med Suppl* 1976; 3: 697-8.
9. Siegel RJ, Atar S, Fishbein MC, Brasch AV, Peterson TM, Nagai T. Noninvasive transcutaneous low frequency ultrasound enhances thrombolysis in peripheral and coronary arteries. *Echocardiography* 2001; 18: 247-57.
10. Siegel RJ, Cumberland DC, Crew JR, DonMichael A, Myler RK, Ariani M, et al. Ultrasound angioplasty. *J Invasive Cardiol* 1991; 3: 135-43.
11. Philippe F, Drobinski G, Bucherer C, Ankri A, Lacombe C, Kremer D, et al. Effects of ultrasound energy on thrombi in vitro. *Cathet Cardiovasc Diagn* 1993; 28: 173-8.
12. Hong AS, Chae JS, Dubin SB, Lee S, Fishbein MC, Siegel RJ. Ultrasonic clot disruption: an in vitro study. *Am Heart J* 1990; 120: 418-22.
13. Siegel RJ, Cumberland DC, Myler RK, DonMichael TA. Percutaneous ultrasonic angioplasty: initial clinical experience. *Lancet* 1989; 2: 772-4.
14. Cintas P, Le Traon AP, Larrue V. High rate of recanalization of middle cerebral artery occlusion during 2-MHz transcranial color-coded Doppler continuous monitoring without thrombolytic drug. *Stroke* 2002; 33: 626-8.
15. Nedelmann M, Brandt C, Schneider F, Eicke BM, Kempfski O, Krummenauer F, et al. Ultrasound-induced blood clot dissolution without a thrombolytic drug is more effective with lower frequencies. *Cerebrovasc Dis* 2005; 20: 18-22.
16. Schäfer S, Kliner S, Klinghammer L, Kaarmann H, Lucic I, Nixdorff U, et al. Influence of ultrasound operating parameters on ultrasound-induced thrombolysis in vitro. *Ultrasound Med Biol* 2005; 31: 841-7.
17. Lauer CG, Burge R, Tang DB, Bass BG, Gomez ER, Alving BM. Effect of ultrasound on tissue-type plasminogen activator-induced thrombolysis. *Circulation* 1992; 86: 1257-64.
18. Behrens S, Daffertshofer M, Spiegel D, Hennerici M. Low-frequency, low-intensity ultrasound accelerates thrombolysis through the skull. *Ultrasound Med Biol* 1999; 25: 269-73.
19. Tachibana K. Enhancement of fibrinolysis with ultrasound energy. *J Vasc Interv Radiol* 1992; 3: 299-303.
20. Akiyama M, Ishibashi T, Yamada T, Furuhashi H. Low-frequency ultrasound penetrates the cranium and enhances thrombolysis in vitro. *Neurosurgery* 1998; 43: 828-32.
21. Luo H, Steffen W, Cercek B, Arunasalam S, Maurer G, Siegel RJ. Enhancement of thrombolysis by external ultrasound. *Am Heart J* 1993; 125: 1564-9.
22. Nilsson AM, Odselius R, Roijs A, Olsson SB. Pro- and antifibrinolytic effects of ultrasound on streptokinase-induced thrombolysis. *Ultrasound Med Biol* 1995; 21: 833-40.
23. Pfaffenberger S, Devcic-Kuhar B, El-Rabadi K, Gröschl M, Speidl WS, Weiss TW, et al. 2MHz ultrasound enhances t-PA-mediated thrombolysis: comparison of continuous versus pulsed ultrasound and standing versus travelling acoustic waves. *Thromb Haemost* 2003; 89: 583-9.
24. Singh M, Rosenschein U, Ho KK, Berger PB, Kuntz R, Holmes DR Jr, et al. Treatment of saphenous vein bypass grafts with ultrasound thrombolysis: a randomized study (ATLAS). *Circulation* 2003; 107: 2331-6.
25. Cohen MG, Tuero E, Bluguermann J, Kevorkian R, Berrocal DH, Carlevaro O. Transcutaneous ultrasound-facilitated coronary thrombolysis during acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2003; 92:454-7.
26. Alexandrov AV, Molina CA, Grotta JC, Garami Z, Ford SR, Alvarez-Sabin J, et al. Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2004; 351: 2170-8.
27. Daffertshofer M, Gass A, Ringleb P, Sitzer M, Sliwka U, Els T, et al. Transcranial low-frequency ultrasound-mediated thrombolysis in brain ischemia: increased risk of hemorrhage with combined ultrasound and tissue plasminogen activator: results of a phase II clinical trial. *Stroke* 2005; 36: 1441-6.
28. Lesnikovich IuA, Adzerokho IE, Shkumatov VM. Structure-functional change in streptokinase exposed to ultrasound. *Biomed Khim* 2003; 49: 183-90.
29. Langévin MP. Les ondes ultrasonores. *Rev Gen Elect* 1928; 23: 626.
30. Dussik KT. Über die möglichkeit hochfrequente mechanische schwingungen als diagnostisches hilfsmittel zu verwerten. *Z Neurol Psychiat* 1942; 174: 153.
31. Johnson AJ, Chisti Y, Banerjee UC. Streptokinase—a clinically useful thrombolytic agent. *Biotechnol Adv* 2004; 22:287-307.
32. Johnson AJ, McCarty WR. Lysis of artificially induced intravascular clots in man by intravenous infusions of streptokinase. *Journal of Clinical Investigations* 1959; 38:1627-1643.
33. Loy JA, Lin X, Schenone M, Castellino FJ, Zhang XC, Tang J. Domain interactions between streptokinase and human plasminogen. *Biochemistry* 2001; 40: 14686-95.
34. Wang CX, Yang Y, Yang T, Shuaib A. A focal embolic model of cerebral ischemia in rats: introduction and evaluation. *Brain Res Brain Res Protoc* 2001; 7: 115-20.
35. Yang Y, Li Q, Wang CX, Jeerakathil T, Shuaib A. Dose-dependent neuroprotection with tiagabine in a focal cerebral ischemia model in rat. *Neuroreport* 2000; 11: 2307-11.
36. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 1986; 17: 472-6.
37. Racine R, Okujava V, Chipashvili S. Modification of seizure activity by electrical stimulation. 3. Mechanisms. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1972; 32: 295-9.
38. Chen CH, Toung TJ, Sapirstein A, Bhardwaj A. Effect of duration of osmotherapy on blood-brain barrier disruption and regional cerebral edema after experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26: 951-8.
39. Noor R, Wang CX, Shuaib A. Hyperthermia masks the neuroprotective effects of tissue plasminogen activator. *Stroke* 2005; 36: 665-9.
40. Ren M, Senatorov VV, Chen RW, Chuang DM. Postinsult treatment with lithium reduces brain damage and facilitates neurological recovery in a rat ischemia/reperfusion model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 6210-5.
41. Hashimoto R, Takei N, Shimazu K, Christ L, Lu B, Chuang DM. Lithium induces brain-derived neurotrophic factor and activates TrkB in rodent cortical neurons: an essential step for neuroprotection against glutamate excitotoxicity. *Neuropharmacology* 2002; 43: 1173-9.

42. Harrison GH, Balcer-Kubiczek EK, Gutierrez PL. In vitro mechanisms of chemopotentiality by tone-burst ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1996; 22: 355-62.
43. Basta G, Lupi C, Lazzarini G, Chiarelli P, L'Abbate A, Rovai D. Therapeutic effect of diagnostic ultrasound on enzymatic thrombolysis. An in vitro study on blood of normal subjects and patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost* 2004; 91: 1078-83.
44. Shlamovitz GZ, Iakobishvili Z, Matz I, Golovchiner G, Lev E, Siegel RJ, et al. In vitro ultrasound augmented clot dissolution: what is the optimal timing of ultrasound application? *Cardiovasc Drugs Ther* 2002; 16: 521-6.
45. Chater BV, Williams AR. Platelet aggregation induced in vitro by therapeutic ultrasound. *Thromb Haemost* 1977; 38: 640-51.
46. Nordquist J, Carlson J, Dougan P, Olsson SB, Salemark L. Does ultrasound influence experimentally induced thrombus formation in the central artery of the rabbit ear? *J Thromb Thrombolysis* 2000; 9: 243-9.
47. Miller DL, Nyborg WL, Whitcomb CC. Platelet aggregation induced by ultrasound under specialized conditions in vitro. *Science* 1979; 205: 505-7.
48. Braaten JV, Goss RA, Francis CW. Ultrasound reversibly disaggregates fibrin fibers. *Thromb Haemost* 1997; 78: 1063-8.
49. Francis CW, Onundarson PT, Carstensen EL, Blinc A, Meltzer RS, Schwarz K, et al. Enhancement of fibrinolysis in vitro by ultrasound. *J Clin Invest* 1992; 90: 2063-8.
50. Blinc A, Francis CW, Trudnowski JL, Carstensen EL. Characterization of ultrasound-potentiated fibrinolysis in vitro. *Blood* 1993; 81: 2636-43.
51. Siddiqi F, Blinc A, Braaten J, Francis CW. Ultrasound increases flow through fibrin gels. *Thromb Haemost* 1995; 73: 495-8.
52. Siddiqi F, Odrlijin TM, Fay PJ, Cox C, Francis CW. Binding of tissue-plasminogen activator to fibrin: effect of ultrasound. *Blood* 1998; 91: 2019-25.

The effects of ultrasound on BBB integration in ischemic brain injury model

Abstract

Sayedi S.¹
Shabanzadeh A.P.^{2*}
Mohaghegh M³
Ghafarpour M²
Shuaib A⁴

1- Department of Physiology,
Faculty of Medicine, Tehran
University of Medical Sciences
2- Iranian Center for
Neurological Disease, ITB and
preparation Research Center.
3- Tehran University of
Medical Sciences
4- Department of Neuroscience
Center, University of Alberta

Background: Ultrasound (US) has been used in neuroprotection after cerebral ischemia, however the mechanism of action remains unclearly. We have previously shown the protective effect of ultrasound on infarction volume and brain edema in ischemic brain injured at normothermic condition. Ultrasound may also amplify the effect of fibrinolytic medications in thrombolysis process. We have also shown that hyperthermia can exacerbate cerebral ischemic injury and that the efficacy of tissue plasminogen activator (tPA) is reduced in the presence of hyperthermia. In this study, the effects of US alone or in combination with tPA on brain ischemic injury were evaluated.

Methods: Focal ischemic brain injury was induced by embolizing a pre-formed clot into the middle cerebral artery in rats. Principally, we examined whether US can reduce the perfusion deficits and, the damage of blood- brain barrier (BBB) in the ischemic injured brain. There are two series of experiments at this study. In the first series, animals were randomly assigned to four groups (n=7 per group) as follows: 1-control (saline), 2-US (1W/cm², 10 duty cycle), 3- US+high- tPA (1W/cm², 10 duty cycle +20 mg/kg) and 4- high – tPA (20 mg/kg). We also examined the effects of US and tPA on BBB integrity after ischemic injury. The animals were assigned into four groups (n=7 per group), treatment is the same as above. BBB permeability was assessed by the Evans blue (EB) extravasations method at 8 h after MCA occlusion. BBB permeability was evaluated by fluorescent detection of extravagated Evans blue dye and Perfusion deficits were analyzed using an Evans blue staining procedure. The perfused microvessels in the brain were visualized using fluorescent microscopy. Areas of perfusion deficits in the brain were traced, calculated and expressed in mm².

Results: The results showed that US improved neurological deficits significantly (p<0.05). The administration of US significantly decreased perfusion deficits and BBB permeability. In the control set, for the US+high tPA, high tPA only and US only groups, the mean perfusion deficits (±SD) were 14.32±3.15, 7.03±4.08, 5.92±1.90 and 9.14±3.37 mm², respectively, 8 h after MCA occlusion (P<0.05).

Conclusions: These studies suggest that US is protective in a rat embolic model of stroke due to decreased perfusion deficits.

Keywords: Stroke, ultrasound, tissue plasminogen activator.

*Corresponding author., Iranian
Center for Neurological Disease.,
Tehran Univeristy of Medical
Sciences.
Tel: +98-21 -66428288
email: shaebanz@sina.tums.ac.ir