

مقاله پژوهشی

بررسی تاثیر فلبوتومی درمانی بر التهاب عصبی ناشی از ترومای مغزی در موش‌های صحرایی

رضا واقع‌بین^۱، محسن خلیلی^۲، صدیقه امیراسماعیلی^۳، مهرداد روغنی^۴، سیدسعید اسماعیلی‌صابر^۱، حسن نامدار^{۱،*}

۱. گروه طب ایرانی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲. مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۳. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی به، به، ایران

۴. مرکز تحقیقات کارآزمایی بالینی طب سنتی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

پذیرش: ۴ خرداد ۱۴۰۱

دریافت: ۲۱ فروردین ۱۴۰۱

چکیده

زمینه و هدف: ضربه مغزی یکی از مشکلات جدی نظام سلامت جهانی می‌باشد. در طب ایرانی فلبوتومی (فصد) به عنوان یک درمان موثر برای ضربه مغزی معرفی شده است. این مطالعه با هدف بررسی اثر فصد ورید صافن بر التهاب عصبی ناشی از ضربه مغزی انجام گرفته است.

روش‌ها: موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار را به صورت تصادفی به سه گروه ۱۲ تایی شَم، ضربه مغزی و فصد تقسیم کردیم. ضربه مغزی توسط مدل کنترل شده کورتیکال اعمال شد. ده دقیقه بعد از ترومای مغزی از ورید صافن موش‌های گروه فصد خونگیری انجام شد. سپس در بازه‌های زمانی ۶ و ۲۴ ساعته معاینه نورولوژیک در حیوانات انجام گردید، همچنین ۶ ساعت بعد از خونگیری پس از جدا کردن مغز حیوانات و هموژنیزه کردن آن مقدار بیومارکرهای استرس اکسیداتیو و التهابی در بافت مغز مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: فلبوتومی درمانی می‌تواند وضعیت نورولوژیک حیوانات را بعد از ضربه مغزی بهبود بخشد. بعلاوه فلبوتومی توانست به طور معنی‌داری سیتوکاین‌های پیش التهابی اینترلوکین ۱-بتا، اینترلوکین ۱۷، فاکتور نکروز تومور آلفا و استرس اکسیداتیو (مالون دی آلدئید) را کاهش دهد و همچنین افزایش معنی‌داری در فاکتور آنتی اکسیدانت (سوپر اکسید دیسموتاز) در مقایسه با گروه ضربه مغزی ایجاد کند، البته بر روی میزان گلووتاتیون پراکسیداز و نیتریک اکساید تغییر معنی‌داری ایجاد نکرد.

نتیجه‌گیری: فلبوتومی ورید صافن در موش‌های ضربه مغزی شده می‌تواند احتمالاً از طریق کاهش سطح بیومارکرهای التهابی و رادیکال‌های آزاد و همچنین با بالا بردن سطح آنتی اکسیدان‌های درون بافت مغز سبب بهبود عملکرد نورولوژیک حیوان‌ها متعاقب ترومای مغزی شود.

واژه‌های کلیدی: التهاب عصبی، ضربه مغزی، طب ایرانی، فلبوتومی، فصد، موش صحرایی

مقدمه

هرگونه تغییری در عملکرد مغزی یا شواهدی از پاتولوژی مغزی که به دنبال نیروی خارجی به سر ایجاد شود را آسیب مغزی ناشی از ضربه TBI^۱ می‌گویند. در سراسر جهان، سالانه بیش از ۵۰ میلیون نفر دچار ضربه مغزی می‌شوند و برآورد شده است که حدود نیمی از جمعیت جهان در طول عمر خود یک یا چند بار دچار ضربه مغزی شده‌اند. طبق پیش‌بینی سازمان بهداشت جهانی تا سال ۲۰۳۰ ناتوانی ناشی از ضربه مغزی دو

تا سه برابر بیشتر از ناتوانی ناشی از سایر بیماری‌های نورولوژیک مانند سکته‌های مغزی و آلزایمر خواهد شد [۱]. همچنین آمارها نشان می‌دهند که کشور ایران نیز از جهت مرگ و میر ناشی از ضربه مغزی در رده بالایی قرار دارد. مهمترین عامل ضربه به سر در ایران تصادفات رانندگی است. طبق گزارش سازمان پزشکی قانونی کشور در ده‌ماهه نخست سال ۱۴۰۰ تعداد کشته‌شدگان ناشی از حوادث جاده‌ای ۱۴۳۴۹ نفر بوده است [۲].

به‌طور کلی متعاقب ضربه مغزی توسط سلول‌های

^۱ Traumatic brain injury (TBI)

ساعت بعد از ضربه به سر کنترل شده (CCI)^۲ مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

حیوانات

برای انجام این مطالعه حیوانی، ۳۶ سر موش آزمایشگاهی بزرگ نر که همگی از نژاد ویستار بودند، از مرکز حیوانخانه دانشگاه شهید بهشتی تهران خریداری شد. وزن موش‌ها بین ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم و سن آنها بین ۸ تا ۱۲ هفته بود. موش‌ها بعد از خریداری به حیوانخانه دانشگاه شاهد منتقل و به گروه‌های شش‌تایی و در قفس‌های جداگانه به مدت یک هفته جهت سازگار شدن با محیط جدید قرار گرفتند. حیوانات در تمام طول مطالعه آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. لازم به ذکر است در طول آزمایشات دمای محیط حیوانخانه حدود ۲۳ درجه سانتیگراد و رطوبت به میزان ۵۰٪ درصد طبق مقررات نگهداری و پرورش در آزمایشگاه حیوانات دانشگاه شاهد تنظیم شده بود. قبل از شروع هر اقدامی بر روی حیوانات کد اخلاق در پژوهش از کمیته اخلاق دانشگاه شاهد گرفته شد (IR.SHAHED.REC.1398.092).

مدل ایجاد ضربه به سر

ضایعه مغزی از طریق مدل ضربه مغزی کنترل شده (CCI) که در مطالعات قبلی کاملاً توصیف شده، انجام گرفت. در این روش بعد از بیهوشی کامل حیوان با تزریق ترکیب کتامین (۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) (ساخت شرکت آلفاسان، هلند) به صورت تزریق داخل صفاقی موهای سر حیوان به طور کامل تراشیده می‌شد. سپس ناحیه مورد نظر ابتدا با الکل ۷۰ درصد سپس با بتادین ۱۰ درصد کاملاً استریل می‌شد. توسط یک تیغ جراحی حدود یک سانتی‌متر پوست سر حیوان برش داده شده و در دستگاه استریوتاکیس قرار می‌گرفت. در ناحیه استخوان آهیانه راست (۲/۵ میلی‌متر عقب‌تر از برگما و ۳ میلی‌متر نسبت به خط وسط) به صورت دایره‌ای به قطر ۶ میلی‌متر توسط مته برقی (ساخت شرکت سوزو، اوکراین) استخوان مجسمه برداشته می‌شد. استخوان جدا شده درون نرمال‌سالین نگهداری تا در

آسیب‌دیده مثل میکروگلیال‌ها و آستروسیت‌های حاضر در محل یکسری مدیاتورهای التهابی مانند اینترلوکین ۱-بتا، اینترلوکین ۱۷، فاکتور نکروز تومور آلفا ترشح می‌شوند که باعث فراخوانی سایر سلول‌های التهابی از سراسر بدن به سمت ناحیه آسیب‌دیده شده و پروسه التهابی را در محل ضربه تشدید می‌کنند. مطالعات نشان داده‌اند که ارتباط مستقیمی بین میزان شدت التهاب ایجاد شده و عوارض ضربه مغزی وجود دارد. البته اخیراً پژوهشگران نشان داده‌اند که التهاب عصبی متعاقب تروما دارای اثرات دوگانه می‌باشد. به این ترتیب که علاوه بر عوارض مخرب می‌تواند اثرات ترمیمی نیز بر جای گذارد. از این رو ایجاد تعدیل در پاسخ التهابی متعاقب تروما به یک هدف مهم برای محققین تبدیل شده است [۳]. در این راستا، اگرچه تاکنون درمان‌های بسیاری برای ضربه مغزی ارائه شده است اما همچنان این بیماری از علل اصلی مرگ و میر و ناتوانی به ویژه در افراد جوان می‌باشد [۴].

از این رو، محققین در جهت یافتن درمانی موثر برای این بیماران با الگوگیری از مبانی طب چینی نشان داده‌اند که خونگیری از نوک انگشتان در موش‌ها می‌تواند نقش موثری در بهبود خون‌رسانی بافتی، [۵] کاهش التهاب سیستمیک، التهاب مغز و همچنین ادم مغزی [۶] و اختلالات انعقادی [۷] متعاقب ضربه مغزی داشته باشد. همچنین مطالعات انسانی انجام شده نشان دادند که فلبوتومی (فصد) می‌تواند از طریق کاهش التهاب عصبی، درد و حرکت در بیماران مبتلا به سیاتیکا را بهبود بخشد [۸] و یا از طریق کاهش میزان رادیکال‌های آزاد و آهن موجود در خون میزان التهاب کبد در بیماران مبتلا به هپاتیت سی را کاهش دهد [۹]. طب ایرانی به‌عنوان یکی از قدیمی‌ترین مکاتب پزشکی جهان با قدمتی بیش از ۱۰ هزار سال، برای پیشگیری از عوارض شدید بیماران ضربه مغزی فصد ورید صافن را در دقایق و ساعت‌های اولیه بعد از تروما به‌عنوان یک روش درمانی پیشنهاد می‌کند [۱۰].

نهایتاً، باتوجه به توصیه کتب معتبر طب ایرانی و همچنین پژوهش اخیر انجام شده در جهت تعیین بازه زمانی فراز و فرود التهاب عصبی متعاقب ضربه مغزی [۱۱] در راستای یافتن راهی برای کمک به این بیماران، بر آن شدیم تا اثر فصد ورید صافن را بر میزان التهاب عصبی، فاکتورهای استرس اکسیداتیو و همچنین رفتارهای نورولوژیک حیوانات در بازه زمانی ۶ و ۲۴

² Controlled cortical impact (CCI)

نمره‌دهی توسط فردی که هیچ اطلاعی از وضعیت مطالعه و گروه‌ها ندارد، با استفاده از جدول ۱ انجام شد [۱۳].

اندازه‌گیری بیومارکرهای التهابی و استرس اکسیداتیو

شش ساعت بعد از ضربه مغزی، موش‌ها به‌طور کامل با ترکیب کتامین و زایلازین بیهوش شدند. سپس به‌دنبال باز کردن قفسه سینه پرفیوژن بافتی از طریق تزریق سرم فیزیولوژیک به مدت یک دقیقه بداخل قلب انجام شد، بعد از شستشوی کامل خون از داخل عروق، سر حیوان از بدن جدا شده و بافت مغز به‌طور کامل از جمجمه خارج می‌شد. نیمکره‌های مغز به‌طور دقیق از خط وسط به دو نیمه تقسیم شده و نیمکره آسیب دیده (نیمکره راست مغز) را بلافاصله داخل ظرف‌های دو و نیم سی‌سی درب‌دار قرار داده و درون ازت مایع منتقل می‌شدند، سپس نمونه‌ها را به یخچال ۸۰- منتقل کردیم. برای اندازه‌گیری بیومارکرهای استرس اکسیداتیو و آنتی‌اکسیدانت شامل مالون دی‌آلدهید، نیتریک اکساید، سوپراکسید دیسموتاز و گلووتاتیون پراکسیداز از روش کالریمتریک و طبق چارچوب تعیین شده توسط شرکت سازنده کیت (شرکت زلیبو، آلمان) اندازه‌گیری انجام شد. و همچنین برای اندازه‌گیری بیومارکرهای التهابی شامل اینترلوکین ۱-بتا، فاکتور نکروز تومور آلفا و اینترلوکین ۱۷- از کیت‌های ماکس دلوکس^۴ ساخت شرکت بایو لجند^۵ آمریکا و با روش الیزا استفاده شد.

گروه‌های آزمایش

گروه‌بندی موش‌ها به صورت کاملاً تصادفی به شکل زیر صورت گرفت:

گروه شم: در این گروه به‌دنبال بیهوشی کامل حیوان و برش پوست سر، استخوان جمجمه به صورت دایره‌ای برش داده می‌شد ولی ضربه مغزی اعمال نمی‌گردید. در ادامه مجدداً استخوان جدا شده در محل خود قرار می‌گرفت و پوست سر در یک محیط کاملاً استریل با نخ نایلون ۳/۰ بخیه می‌شد بعد از به‌هوش آمدن کامل، حیوان‌ها به قفس‌های خود منتقل می‌شدند.

انتهای مراحل ضربه مغزی مجدداً روی محل برداشته شده قرار گیرد. سپس موش به زیر دستگاه ایجاد کننده ضایعه مغزی (ساخت شرکت بهپو الکترونیک شایان، ایران) انتقال داده می‌شد. بعد از قراردادن سر حیوان در دستگاه استریوتاکس و تنظیم پارامترهای دستگاه، ضربه مغزی اعمال می‌شد. پارامترهای دستگاه طبق مطالعات قبلی به نحوی تنظیم شد، که ضایعه مغزی با شدت متوسط (عمق ضایعه از سطح کورتکس ۳-۲ میلی‌متر) ایجاد کند. برای این منظور سرعت پیستون ۴ متر بر ثانیه در نظر گرفته شد. در ادامه بلافاصله پس از ضربه مغزی بعد از تمیز کردن خونریزی محل ضربه با پنبه استریل، استخوان جدا شده در محل خود قرار گرفته و پوست سر توسط نخ نایلون ۳/۰ بخیه زده می‌شد [۱۲].

فلبوتومی ورید صافن

به‌دنبال بیهوشی حیوان با ترکیب کتامین و زایلازین ابتدا موهای پای راست حیوان تا ناحیه فوقانی ران کاملاً تراشیده شد. ده دقیقه بعد از ایجاد ضربه مغزی ابتدا قسمت فوقانی ران راست موش توسط یک باند الاستیک با فشار ملایم جهت برجسته‌تر شدن ورید صافن بسته شد. سپس توسط تیغ جراحی شماره ۱۱ برش طولی به سائز حدود ۲ میلی‌متر در ورید صافن پای راست در موازات مفصل مچ پا ایجاد شد. بلافاصله برای افزایش برقراری جریان خون بداخل ورید صافن و آسانتر شدن خونگیری پای موش درون ظرف آب مدرج با دمای ۴۰ درجه به مدت ۱۰ ثانیه قرار می‌گرفت. تقریباً حدود ۰/۶ سی‌سی خون از ورید صافن خارج شده و بلافاصله توسط یک حوله تمیز کاملاً خشک و جهت جلوگیری از افت دمای بدن، حیوان در زیر دستگاه حرارتی ملایم قرار می‌گرفت. بعد از هوشیاری، حیوانات هر کدام به قفس جداگانه‌ای منتقل می‌شدند.

روش اندازه‌گیری تست رفتاری

وضعیت نورولوژیک حیوانات بوسیله جدول نمره‌بندی شدت عصبی تعدیل شده^۳ بلافاصله قبل از ایجاد ضربه، ۶ و ۲۴ ساعت پس از ضربه مغزی اندازه‌گیری شد. در این معیار بر اساس ارزیابی وضعیت حرکتی، تعادلی، حسی و رفلکس‌های حیوان، نمره‌دهی انجام می‌شود و هرچه حیوان نمره بالاتری کسب کند نشان دهنده شدت بیشتری از آسیب مغزی می‌باشد.

⁴ deluxe MAX™

⁵ Biolegend

³ Modified Neurological Severity Score (mNSS)

جدول ۱- نحوه نمره‌دهی و معاینه نورولوژیک حیوان

Modified Neurological Severity Scores (mNSS)

آزمایش حرکتی (مجموع امتیاز ۰-۶)		
امتیاز	نحوه راه رفتن حیوان بر روی زمین	امتیاز
۰	راه رفتن طبیعی	۱
۱	عدم توانایی در راه رفتن مستقیم	۱
۲	حرکت دورانی در یک جهت	۱
۳	افتادن به یک سمت	
آزمایش‌های حسی (مجموع امتیاز ۰-۲)		
۱	عدم پاسخ به آزمایش بینایی و لامسه	
۱	عدم پاسخ به تغییر وضعیت (بررسی حساسیت عمقی، با فشردن پا به لبه میز ماهیچه‌های حرکتی پا تحریک می‌شوند)	
آزمایش‌های حفظ تعادل (Beam Balance Test) (مجموع امتیاز ۰-۶)		
۰	حفظ تعادل بر روی میله با وضعیت ثابت	
۱	چنگ زدن به کناره میله	
۲	بغل کردن میله و آویزان شدن یک اندام از میله	
۳	بغل کردن میله و آویزان شدن دو اندام از میله و یا چرخش روی میله بعد از ۶۰ ثانیه	
۴	افتادن از میله با وجود تلاش (بعد از ۴۰ ثانیه)	
۵	افتادن از میله بعد از ۲۰ ثانیه	
۶	افتادن از میله بدون هیچ تلاشی برای نگه داشتن یا اینکه کمتر از ۲۰ ثانیه بپایند	
چک رفلکس‌ها و حرکات غیرطبیعی		
۱	عدم وجود رفلکس لاله گوش	
۱	عدم وجود رفلکس قرنیه	
۱	عدم وجود رفلکس جهیدن	
۱	تشنج، مایوکلونوس و مایودیستونی	
حداکثر امتیاز در این آزمون ۱۸ می‌باشد.		
ناتوانی شدید: نمره بین ۱۳ تا ۱۸		
ناتوانی متوسط: نمره بین ۷ تا ۱۲		
ناتوانی خفیف: نمره بین ۱ تا ۶		

بررسی‌های آماری

پس از جمع‌آوری داده‌ها، با استفاده از نرم افزار SPSS 20 ابتدا توزیع نرمال داده‌ها بررسی، سپس در صورت پارامتریک بودن داده‌ها از آنالیز واریانس یکطرفه^۶ و آزمون تکمیلی توکی برای مقایسه داده‌های بین هر دو گروه استفاده شد. در صورتی که داده‌ها توزیع نرمالی نداشتند از آزمون کروسکال-والیس^۷ و آزمون تکمیلی مربوطه استفاده شد. تفاوت بین گروه‌ها با $p < 0.05$ معنی‌داری در نظر گرفته شد.

گروه ضربه مغزی: این گروه بعد از بیهوشی و برش استخوان جمجمه، توسط پیستون دستگاه ایجادکننده ضربه مغزی کنترل شده، ضربه بر روی سطح قشر مغز وارد می‌شد. گروه فصد: در این گروه ده دقیقه بعد از این که موش دچار ضربه مغزی شد، از ورید صافنوس پای راست فلپوتومی انجام می‌شد.

^۶ ANOVA^۷ Kruskal-wallis



شکل ۱- تصویر مغز موش صحرایی در گروه‌های شَم، ضربه مغزی و فصد. در ردیف بالا نمای کلی مغز و در ردیف پایین برش عرضی از محل آسیب، رنگ‌آمیزی شده با روش هماتوکسیلین-ئوزین ۲۴ ساعت بعد از ضربه مغزی نشان داده شده است.

یافته‌ها

شکل ۱ تصویر نمای کلی مغز موش صحرایی و همچنین برش عمودی محل آسیب، ۲۴ ساعت بعد از ایجاد ضربه مغزی برای گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد.

تاثیر فصد ورید صافن بر معاینه نورولوژیک

جدول ۲ نمره وضعیت نورولوژیک حیوانات قبل از ضربه، ۶ و ۲۴ ساعت بعد از ضربه مغزی را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود بین سه گروه قبل از ایجاد ضربه تغییر معنی‌داری وجود ندارد، ولی بعد از تروما در هر دو گروه ضربه مغزی و فصد نسبت به گروه شَم تفاوت معنی‌دار دیده می‌شود ($p < 0.001$).

تاثیر فصد بر میزان بیومارکرهای آنتی اکسیدانت و استرس اکسیداتیو درون مغز

جدول ۳ میانگین آنتی اکسیدان‌های سوپراکسید دیسموتاز و

گلوتاتیون پراکسیداز و همچنین اکسیدان‌های مالون دی‌آلدهید و نیتریک اکساید درون بافت مغز در بین گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد. همانطور که واضح است شش ساعت بعد از تروما میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز درون بافت مغز در گروه ضربه مغزی در مقایسه با گروه شَم به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرده است ($p < 0.001$). همچنین میزان سوپراکسید دیسموتاز در گروه فصد در مقایسه با گروه ضربه مغزی به طور معنی‌داری افزایش یافته است ($p < 0.001$). در مورد گلوتاتیون پراکسیداز بین گروه‌های فصد و ضربه مغزی تغییر معنی‌داری مشاهده نشد. در خصوص مالون دی‌آلدهید و نیتریک اکساید حدود ۶ ساعت بعد از ضربه نسبت به گروه شَم افزایش معنی‌دار مشاهده شد ($p < 0.001$) که این افزایش در مورد مالون آلدهید در گروه فصد بصورت معنی‌داری تعدیل و به میزان آن در گروه شَم نزدیک شد.

جدول ۲- اثر فصد بر نمره معاینات نورولوژیک ناشی از ضربه مغزی در موش صحرایی

گروه	mNSS (زمان ۰)	mNSS (۶ ساعت بعد از ضربه)	mNSS (۲۴ ساعت بعد از ضربه)
شَم	.	.	.
ضربه مغزی	.	*** ۶/۱±۰/۳۲	*** ۴/۶±۰/۲۷
فصد	.	### ۳/۱۶±۰/۷۵	### ۲/۶±۰/۴۱

*** و ###: تفاوت معنی‌دار به ترتیب با گروه شَم و ضربه مغزی با $p < 0.001$. داده‌ها میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین هستند.

جدول ۳- اثر فصد بر بیومارکرهای آنتی اکسیدانت و استرس اکسیداتیو ناشی از ضربه مغزی در موش صحرایی

گروه	سوپراکسید دیسموتاز (واحد/میلی گرم پروتیین بافت مغز)	گلوتاتیون پراکسیداز (واحد/میلی گرم پروتیین بافت مغز)	مالون دی آلدید (نانو مول/میلی گرم پروتیین بافت مغز)	نیتریک اکساید (واحد/میلی گرم پروتیین بافت مغز)
شم	۱۱/۳۶±۰/۶۸	۴/۴۰±۰/۳۳	۶/۳۶۰±۰/۶۵	۰/۱۳±۰/۰۲
ضربه مغزی	***۴/۸۲±۰/۶۸	***۱/۵۷±۰/۳۳	***۱۱/۰۴±۰/۶۵	***۰/۲۸±۰/۰۲۱
فصد	###۸/۱۸±۰/۶۸	۲/۰۶±۰/۳۳	#۹/۰۲±۰/۶۵	۰/۲۳±۰/۰۲

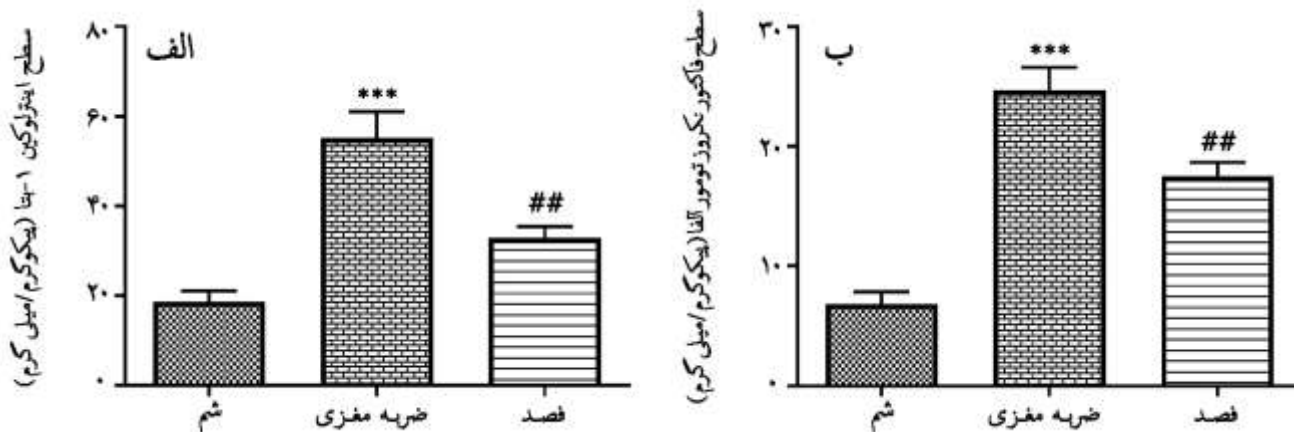
***: تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه شم با $p < ۰/۰۰۱$ و # و ### به ترتیب تفاوت معنی دار با $۰/۰۵$ و $p < ۰/۰۰۱$ نسبت به گروه ضربه مغزی می باشد. داده ها میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین هستند.

تاثیر فصد بر روی میزان اینترلوکین ۱-بتا و فاکتور نکروز تومور آلفا در بافت مغز

میزان سطح اینترلوکین ۱-بتا درون بافت مغز شش ساعت بعد از تروما در نمودار ۱الف نشان داده شده است. نتایج نشان داد که اینترلوکین ۱-بتا در گروه ضربه مغزی تقریباً سه برابر نسبت به گروه شم افزایش یافته است ($p < ۰/۰۰۱$). همچنین بررسی ها نشان داد که فصد به طور معنی داری مانع افزایش اینترلوکین ۱-بتا می شود ($p < ۰/۰۰۱$). همچنین درخصوص فاکتور نکروز تومور آلفا مشاهده شد افزایش بارز آن بدنبال ضربه مغزی بصورت کاملاً معنی داری توسط فصد کاهش یافته است (نمودار ۱ب، $p < ۰/۰۰۱$).

تاثیر فصد بر روی میزان اینترلوکین ۱۷- در بافت مغز

مقایسه سطح اینترلوکین ۱۷- در بین گروه های مختلف شش ساعت بعد از تروما در نمودار ۲ نشان داده شده است. ضربه ایجاد شده تقریباً دو برابر سطح اینترلوکین ۱۷- را در بافت مغز افزایش می دهد ($p < ۰/۰۰۱$). فصد مانع از افزایش چشمگیر سطح اینترلوکین ۱۷- درون بافت مغز متعاقب ضربه مغزی می شود ($p < ۰/۰۰۱$).

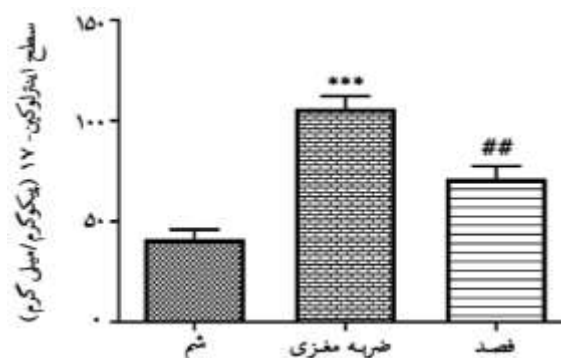


نمودار ۱- اثر فصد بر میزان اینترلوکین ۱-بتا (الف) و فاکتور نکروز تومور آلفا (ب) ناشی از ضربه مغزی در موش صحرایی. ستون ها نشان دهنده میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین هستند. *** و ## به ترتیب تفاوت معنی دار با گروه شم و ضربه مغزی با $۰/۰۰۱$ و $p < ۰/۰۰۱$ را نشان می دهند.

التهابی ایجاد می‌شود و نسبت به حالت اول کندتر ولی پایداری و ماندگاری بیشتری دارد [۱۵]. اگرچه در پژوهش حاضر تعداد سلول‌های التهابی فراخوانده شده از گردش خون محیطی به مغز اندازه‌گیری نشد ولی اینگونه به نظر می‌رسد که فصد ورید صافن از طریق آسیب دیواره عروق و فعال‌سازی سلول‌های اندوتلیال تعدادی از سلول‌های التهابی موجود در گردش خون محیطی را به سمت پا منحرف کند و از این طریق اثرات ضد التهابی در مغز ایجاد کند.

آسیب اندوتلیال عروق که در مقالات به اندوتلیوپاتی معروف است، مکانیسم‌های بسیار پیچیده‌ای دارد. یکی دیگر از ابعاد اندوتلیوپاتی که تاکنون شناخته شده است، تحریک سیستم سمپاتیک و در نتیجه آزادسازی کاته کولامین‌ها می‌باشد. این فرایند می‌تواند اثرات دو گانه‌ای داشته باشد، به این ترتیب که باعث ایجاد هموستاز در محل آسیب اندوتلیوم و همچنین کاهش ریسک انعقاد خون و بهبود خون‌رسانی و اکسیژن‌رسانی در عروق ریز سایر نقاط بدن شود [۱۶]. اگرچه در مطالعه ما تاثیر فصد بر سیستم سمپاتیک مورد بررسی قرار نگرفت، ولی با توجه به اینکه فصد آسیبی در دیواره اندوتلیوم عروق ایجاد می‌کند، به نظر می‌رسد از این طریق نقش محرکی بر سیستم سمپاتیک داشته باشد. البته تعدادی از مطالعات اخیر نتایج متضادی را نشان داده‌اند به این ترتیب که افزایش فعالیت سیستم سمپاتیک بعد از ضربه مغزی یک فاکتور با پیش‌آگهی منفی تلقی می‌شود و داروهای مهار کننده آدرنرژیک را به عنوان یک درمان کمک کننده برای این بیماران پیشنهاد کرده بودند [۱۷]. از این منظر مطالعات بیشتری نیاز است که تاثیر فلبوتومی بر سیستم سمپاتیک و در نتیجه ضربه مغزی را بصورت دقیق‌تر مورد بررسی قرار دهد.

همچنین مطالعات نشان داده‌اند، که متعاقب ترومای مغزی سطح گلوتامات درون بافت مغز بالا می‌رود و در نتیجه باعث تسریع در ورود کلسیم به درون نورون‌ها می‌شود و این حالت باعث شروع فرایند استرس اکسیداتیو می‌گردد. در واقع طی این فرایند بین بیومارکرهای آنتی‌اکسیدانت (گلوکاتایون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز) و بیومارکرهای اکسیدانت (نیتریک اکساید، مالون دی‌آلدهید) عدم تعادل ایجاد می‌شود و بیومارکرهای اکسیدانتی بیشتر از نوع آنتی‌اکسیدانتی تولید می‌شوند، که این عدم تعادل باعث آسیب‌های ناشی از استرس



نمودار ۲- اثر فصد بر میزان اینترلوکین-۱۷ ناشی از ضربه مغزی در موش صحرایی. ستون‌ها نشان دهنده میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین می‌باشند. *** و ## به ترتیب تفاوت معنی‌دار با گروه شم و ضربه مغزی با $p < 0.01$ و 0.001 را نشان می‌دهند.

بحث

در این مطالعه سعی شد، به صورت علمی به مستند کردن یافته‌های طب سنتی ایران برای بیماران ضربه مغزی پرداخته شود. از این جهت تاثیر فصد ورید صافن بر ضربه مغزی در مدل حیوانی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که فصد ورید صافن در دقایق اولیه بعد از ضربه مغزی در مدل حیوانی می‌تواند باعث تخفیف بیومارکرهای التهابی و همچنین استرس اکسیداتیو در بافت مغز شود. علاوه بر این نشان داده شد که فصد در بهبود معاینه نورولوژیک حیوانات نیز بعد از ۶ و ۲۴ ساعت موثر است.

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که به دنبال ضربه مغزی سلول‌های میکروگلیال و آستروسیت‌های آسیب دیده شروع به فعالیت می‌کنند و به دنبال آن یکسری مواد جذاب ترشح می‌کنند که باعث فراخوانی سلول‌های التهابی از گردش خون محیطی به سمت ناحیه آسیب دیده می‌شوند و تجمع بیش از حد سلول‌های التهابی در ناحیه آسیب دیده ممکن است، باعث بدتر شدن عوارض مغزی شود [۱۴]. و از طرف دیگر پژوهش‌ها نشان داده‌اند که آسیب اندوتلیوم دیواره عروق می‌تواند نقش یک محرک قوی برای جذب و فراخوانی سلول‌های التهابی را داشته باشد. همچنین محققان دریافته‌اند که دو نوع فعال‌سازی سلول‌های اندوتلیال وجود دارد، نوع اول که متعاقب تماس سلول‌های لوکوسیت و پلاکت‌ها با محل اتصال سلول‌های اندوتلیال فعال می‌شود و باعث ایجاد یک پاسخ سریع ولی کوتاه می‌شود و نوع دوم که متعاقب آزاد شدن مارکرهای

اکسیداتیو و اختلال در عملکرد مغزی می‌شود [۱۸] اگرچه در مطالعه ما فصد کردن حیوان تغییر معنی‌داری را بر روی میزان گلوکاتایون پراکسیداز و نیتریک اکساید موجود در بافت مغز ایجاد نکرد ولی نشان داده شد که فصد می‌تواند از طریق کاهش بیومارکر اکسیداتیو مالون دی‌آلدهید و همچنین افزایش بیومارکر آنتی‌اکسیدانت سوپراکسید دیسموتاز عوارض استرس اکسیداتیو ناشی از ضربه مغزی را کاهش دهد.

علاوه بر این در مطالعه حاضر، متعاقب تروما به سر، سطح سیتوکین‌های التهابی مانند اینترلوکین ۱-بتا، فاکتور نکروز تومور آلفا و اینترلوکین-۱۷ درون بافت مغز افزایش پیدا کردند و همچنین نشان داده شد که فصد ورید صافن اثر کاهندگی معنی‌داری بر این سیتوکین‌های التهابی شش ساعت بعد از تروما دارد. یکی از مهمترین سیتوکین‌هایی که نقش بسیار مهمی را در القای آپوپتوز نورونی ایفا می‌کند، اینترلوکین-۱۷ می‌باشد [۱۹]، همچنین این سیتوکین اهمیت بسزایی در بیان کموکاین‌های جذاب توسط سلول‌های میکروگلیال دارد. در واقع در فراخوانی سلول‌های ایمنی از سراسر بدن به ناحیه آسیب دیده نقش کلیدی دارد، اهمیت آن تا حدی است که، سطح این سیتوکین به عنوان یک عامل تعیین کننده در میزان شدت آسیب ثانویه ناشی از ضربه مغزی در نظر گرفته می‌شود. از این‌رو تغییر خفیف در سطح آن نقش مهمی در تعیین پیش‌آگاهی بیماران ضربه مغزی دارد [۲۰]. در مطالعه ما نشان داده شد که فصد ورید صافن می‌تواند به طور معنی‌داری سطح اینترلوکین-۱۷ را در مغز کاهش دهد. همچنین مطالعات حیوانی بسیاری نشان داده‌اند که تجویز مهارکننده‌های فاکتور نکروز تومور آلفا در مدل‌های حیوانی ضربه مغزی، باعث کاهش میزان آسیب و بهبود عملکردهای شناختی حیوانات شده است [۲۱]. علاوه بر این اثرات التهابی اینترلوکین ۱-بتا نیز اثبات شده است و نشان داده شده است که کاهش سطح این سیتوکین در بهبود عملکرد مغز، یادگیری و کاهش آسیب بافتی متعاقب تروما موثر است [۲۲].

طبق دیدگاه ابن سینا و دیگر حکمای طب ایرانی خونگیری شدید ممکن است، باعث تشدید آسیب مغزی شود [۱۰]. مطالعات اخیر نیز نشان داده‌اند که هیپوپرفیوژن و شوک دو علت بسیار مهم برای ایجاد التهاب مغز متعاقب ضربه مغزی می‌باشند [۲۳]. علاوه بر این نشان داده شده است که افت پلاکتی و اختلال در عملکرد پلاکت‌ها که در خونریزی شدید

ایجاد می‌شود، پیش‌آگاهی بیماران ضربه مغزی را قویا بدتر می‌کند [۲۴]. از سوی دیگر در یک مطالعه‌ی انسانی که بر روی نوزادان انجام شد، نشان داده شد که خونگیری از پاشنه پای نوزاد به علت ایجاد تحریک دردناک، می‌تواند فشار داخل مغزی را افزایش دهد [۲۵]. این یافته‌ها همگی بیانگر این موضوع هستند که فصد خون می‌تواند بشکل دو سویه عمل کند، در صورتی که به جا و به موقع و با شدت مناسب انجام نشود، ممکن است عوارض ضربه مغزی را تشدید کند. بنابراین اینگونه به نظر می‌رسد، که برای درک دقیق مکانیسم اثر فصد و برای یافتن اندیکاسیون‌ها و کنترااندیکاسیون‌های آن و همچنین میزان خونگیری طی فصد نیازمند طراحی مطالعات دقیق بیشتری می‌باشیم، یکی از مطالعاتی که ممکن است برای یافتن مکانیسم اثر فصد به ما کمک کند، نشاندار کردن سلول‌های التهابی در گردش خون و تصویربرداری از آن‌ها به دنبال ضربه مغزی و انجام فصد می‌باشد. به هر حال محقیق این پژوهش سعی دارند در مطالعات بعدی به سایر عوامل و جوانبی که می‌توانند بر روی دقت این تحقیق موثر باشند، بپردازند.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر عدم بررسی فصد در گروه شَم و همچنین وسعت ضایعه مغزی از طریق برنامه‌هایی مانند ImageJ می‌باشد که پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی این موارد در نظر گرفته شوند. علاوه بر این در پژوهش حاضر تنها به بررسی سطح مارکرهای التهابی و استرس اکسیداتیو درون بافت مغز پرداخته شد. از این جهت برای بررسی اثر فصد بر التهاب سیستمیک متعاقب ترومای مغزی توصیه می‌گردد، در پژوهش‌های آینده میزان سلول‌های التهابی و همچنین بیومارکرهای التهابی و استرس اکسیداتیو موجود در سرم نیز اندازه‌گیری گردد.

نتیجه‌گیری

در مجموع، مطالعه حاضر نشان داد که فلبوتومی ورید صافن تقریباً بلافاصله بعد از ضربه مغزی می‌تواند از طریق افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها و همچنین کاهش اکسیدان‌ها و فاکتورهای التهابی بافت مغز، باعث بهبود علائم نورولوژیک در موش‌های صحرایی ضربه مغزی شده گردد. امیدواریم این مطالعه برای پژوهشگرانی که قصد دارند به بررسی توصیه‌های طب ایرانی در بیماران ضربه مغزی بپردازند، موثر واقع گردد.

ملاحظات مالی

این پژوهش با حمایت دانشگاه شاهد انجام شده است (شماره گرانت ۳۰۵۱۸).

نقش نویسندگان

رو: ایده و انجام مطالعه و نگارش مقاله، م.خ: نظارت بر اجرای مطالعه و طراحی و تحلیل نتایج، ص.ا: نگارش مقاله و نظارت بر انجام مطالعه، م.ر: طراحی مطالعه، س.س.ا: طراحی مطالعه، ح.ن: نظارت بر اجرای مطالعه، ایده و طراحی مطالعه.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

فهرست منابع

- [1] Maas AIR, Menon DK, Adelson PD, Andelic N, Bell MJ, Belli A, Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *Lancet Neurol* 16 (2017) 987-1048.
- [2] Iranian Legal Medicine Organization. Available from: https://www.lmo.ir/web_directory/53999-%D8%AA%D8%B5%D8%A7%D8%AF%D9%81%D8%A7%D8%AA.html.
- [3] Kumar A, Loane D, Neuroinflammation after traumatic brain injury: opportunities for therapeutic intervention. *Brain Behav Immun* 26 (2012) 1191-1201.
- [4] Agimi Y, Marion D, Schwab K, Stout K, Estimates of long-term disability among US service members with traumatic brain injuries. *J Head Trauma Rehabil* 36 (2021) 1-9.
- [5] Li B, Tian J-P, Zhang S, Guo Y, Tu Y, Yi T-L, Guo Y-M, Zhou D, Cheng S-X, Effect of bloodletting acupuncture at twelve jing-well points of hand on microcirculatory disturbance in mice with traumatic brain injury. *Zhongguo Zhen Jiu* 39 (2019) 1075-1080.
- [6] Liu B-h, Zhou D, Guo Y, Zhang S, Guo Y-m, Guo T-t, Chen X-y, Gong Y-n, Tang H-l, Xu Z-f, Bloodletting puncture at hand twelve Jing-Well points relieves brain edema after severe traumatic brain injury in rats via inhibiting MAPK signaling pathway. *Chin J Integr Med* 27 (2021) 291-299.
- [7] Li B, Zhou X, Yi T-L, Xu Z-W, Peng D-W, Guo Y, Guo Y-M, Cao Y-L, Zhu L, Zhang S, Cheng S-X, bloodletting puncture at hand twelve Jing-Well points improves neurological recovery by ameliorating acute traumatic brain injury-induced coagulopathy in mice. *Front Neurosci* 14 (2020) 403.
- [8] Amini MH, Esmaili SS, Barzi DM, Fesharaki MG, The effect of FASD (Bloodletting) in the treatment of sciatica: a randomized clinical trial study. *Ann Med Health Sci Res* 8 (2018) 391-396.
- [9] KaitoMotoh M, Yoshinao I, Naoki K, Hideaki F, Esteban T, Iron reduction therapy by phlebotomy reduces lipid peroxidation and oxidative stress in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 41 (2006) 921-922.
- [10] Vaghebin R, Khalili M, Amiresmaili S, Namdar H, Mousavi MJ, Treatment of traumatic brain injury from the viewpoint of Avicenna (Ibn Sina): A historical review. *Interdiscip Neurosurg Adv Tech Case Manag* 28 (2022) 101498.
- [11] Radpour M, Choopani S, Gholami Pourbadie H, Sayyah M, Time course of neuroinflammation in rats after induction of traumatic brain injury by controlled cortical impact. *Iran J Physiol Pharmacol* 3 (2019) 196-202.
- [12] Osier ND, Dixon CE, The controlled cortical impact model: applications, considerations for researchers, and future directions. *Front Neurol* 7 (2016) 134.
- [13] Nourzad Z, Khazali H, Ghadiri T, Neuroprotective effects of concomitant use of erythropoietin and progesterone in traumatic brain injury. *Shefaye Khatam* 2 (2014) 1-12.
- [14] Nadine Kerr N, Pablo de Rivero Vaccari J, Dietrich WD, RW K, Neural-respiratory inflammasome axis in traumatic brain injury. *Exp Neurol* 323 (2020) 113080.
- [15] Yang X, Chang Y, Wei W, Endothelial dysfunction and inflammation: immunity in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm* 2016 (2016) 6813016.
- [16] Ostrowski SR, Johansson PI, Endothelial glycocalyx degradation induces endogenous heparinization in patients with severe injury and early traumatic coagulopathy. *J Trauma Acute Care Surg* 73 (2012) 60-66.
- [17] Ley EJ, Leonard SD, Barmparas G, Dhillon NK, Inaba K, Salim A, O'Bosky KR, Tatum D, Azmi H, Ball CG, Beta blockers in critically ill patients with traumatic brain injury: results from a multicenter, prospective, observational American Association for the Surgery of Trauma study. *J Trauma Acute Care Surg* 84 (2018) 234-244.
- [18] Amiresmaili S, Khaksari M, Shahrokhi N, Abolhassani M, Evolution of TLR4 role in mediating the hepatoprotective effects of estradiol after traumatic brain injury in male rats. *Biochem Pharmacol* 178 (2020) 114044.
- [19] Wu J, Guo J, Cao Q, Wang Y, Chen J, Wang Z, Yuan Z, Autophagy impacts on oxaliplatin-induced hepatocarcinoma apoptosis via the IL-17/IL-17R-JAK2/STAT3 signaling pathway. *Oncol Lett* 13 (2017) 770-776.
- [20] Li T, Zhang Y-m, Han D, Hua R, Guo B-n, Hu S-q, Yan X-l, Xu T, Involvement of IL-17 in secondary brain injury after a traumatic brain injury in rats. *Neuromolecular Med* 19 (2017) 541-554.
- [21] Baratz R, Tweedie D, Wang J-Y, Rubovitch V,

- Luo W, Hoffer BJ, Greig NH, Pick CG, Transiently lowering tumor necrosis factor- α synthesis ameliorates neuronal cell loss and cognitive impairments induced by minimal traumatic brain injury in mice. *J Neuroinflammation* 12 (2015) 1-14.
- [22] [22] Clausen F, Hånell A, Israelsson C, Hedin J, Ebendal T, Mir AK, Gram H, Marklund N, Neutralization of interleukin-1 β reduces cerebral edema and tissue loss and improves late cognitive outcome following traumatic brain injury in mice. *Eur J Neurosci* 34 (2011) 110-123.
- [23] [23] Maegele M, Schöchl H, Menovsky T, Maréchal H, Marklund N, Buki A, Stanworth S, Coagulopathy and haemorrhagic progression in traumatic brain injury: advances in mechanisms, diagnosis, and management. *Lancet Neurol* 16 (2017) 630-647.
- [24] [24] Sillesen M, Rasmussen LS, Jin G, Jepsen CH, Imam A, Hwabejire JO, Halaweish I, DeMoya M, Velmahos G, Johansson PI, Assessment of coagulopathy, endothelial injury, and inflammation after traumatic brain injury and hemorrhage in a porcine model. *J Trauma Acute Care Surg* 76 (2014)12-20.
- [25] [25] Bellieni CV, Burroni A, Perrone S, Cordelli DM, Nenci A, Lunghi A, Buonocore G, Intracranial pressure during procedural pain. *J Neonatal* 84 (2003) 202-205.

Research paper

Effect of therapeutic phlebotomy on neuroinflammation following traumatic brain injury in rats

Reza Vaghebin¹, Mohsen Khalili², Sedigheh Amiresmaili³, Mehrdad Roghani²,
Seyed Saeid Esmaeili Saber¹, Hasan Namdar^{4, 1*}

¹ Department of Traditional Persian Medicine, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

² Neurophysiology Research Center, Shahed University, Tehran, Iran

³ Department of Physiology, Bam University of Medical Sciences, Bam, Iran

⁴ Traditional Medicine Clinical Trial Research Center, Shahed University, Tehran, Iran

Received: 10 April 2022

Accepted: 25 May 2022

Abstract

Background and Aim: Traumatic brain injury (TBI) is a global health problem. Persian medical manuscripts recommended phlebotomy as a potent treatment for TBI. This study aimed to evaluate the possible effect of saphenous vein phlebotomy (SVP) on neuroinflammation after TBI.

Methods: Adult male Wistar rats were divided randomly into three main groups (n = 12): sham group, TBI group, and TBI+SVP group. Induction of trauma was made through a controlled cortical impactor (CCI) device and SVP treatment was applied 10 min after TBI. Then, neurological functions were evaluated 6 and 24 hours post-surgery. Furthermore, 6 hours after bloodletting inflammatory and oxidative stress biomarkers were measured in the rats' brains.

Results: Therapeutic phlebotomy could improve neurological scores post-TBI. In addition, phlebotomy application significantly reduced proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-17, and TNF- α) and oxidative stress factors as shown by reduction of malondialdehyde (MDA) and elevation of superoxide dismutase (SOD) with no significant effect on glutathione peroxidase (GPx) and nitric oxide (NO) in the brain 6 h after TBI.

Conclusion: Finally, SVP possibly through its attenuation of neuroinflammation and free radicals, and also increased antioxidant activity in the rats' brains could ameliorate neurological impairment following TBI.

Keywords: Neuroinflammation, Traumatic brain injury, Persian medicine, Phlebotomy, Fasd, Rat

Please cite this article as follows:

Vaghebin R, Khalili M, Amiresmaili S, Roghani M, Esmaeili Saber SS, Namdar H, Effect of therapeutic phlebotomy on neuroinflammation following traumatic brain injury in rats. *Iran J Physiol Pharmacol* 6 (2022) 85-95.

*Corresponding author: h.namdar@shahed.ac.ir (ORCID: 0000-0003-3244-1639)