



Intensification of brain injury and blood-brain barrier permeability by short-term hypertension in experimental model of brain ischemia/reperfusion

Mohammad Taghi Mohammadi^{1*}, Gholam Abbas Dehghani²

1. Dept. of Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Dept. of Physiology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Received: 16 Nov 2013

Accepted: 13 Mar 2014

Abstract

Introduction: Arterial hypertension is one of the causes of stroke, and as one of the vasculotoxic conditions intensifies ischemic stroke complications. The aim of the present study was to analyze the effects of short-term cerebral hypertension on ischemia/reperfusion injury and pathogenesis of ischemic stroke.

Methods: The experiments were performed on three groups of rats (N=36); Sham, control ischemia and hypertensive ischemia. Rats were made acutely hypertensive by abdominal aortic coarctation, and after 8 days, were randomly selected for cerebral ischemia induced by middle cerebral artery occlusion (MCAO) for 60 min followed by 12 h reperfusion. The rats were slaughtered under deep anesthesia for measurement of cerebral injury area by triphenyltetrazolium chloride staining method or blood-brain barrier (BBB) integrity disruption by Evans blue extravasation technique.

Results: Arterial pressure was increased >36% in hypertensive rats, and blood flow of the ischemic region was reduced by 80% in the ischemic groups compared with the sham. MCAO induced infarction in large areas of the right hemisphere in hypertensive rats compared with control ischemic rats, and subcortical infarct volume was significantly more in ischemic groups (236 ± 43 vs. 139 ± 25 mm³). MCAO also increased Evans blue extravasations in hypertensive rats (9.48 ± 2.03 µg/g) more than non-hypertensive rats (5.09 ± 1.41 µg/g).

Conclusion: The findings of present study indicate that the short-term hypertension intensifies the ischemia/reperfusion-induced brain injuries. This type of hypertension also causes severe damage in BBB function and enhanced cerebrovascular permeability after brain ischemia.

Key words: Ischemia/reperfusion injury, Hypertension, Vascular permeability, Cerebral injury

* Corresponding author e-mail: Mohammadi.mohammadt@yahoo.com
Mohammadimohammadt@bmsu.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

تشدید آسیب مغزی و نفوذپذیری سد خونی - مغزی ناشی از پرفشاری شریانی کوتاه - مدت در مدل آزمایشگاهی ایسکمی/خونرسانی مجدد مغز

محمدتقی محمدی^{۱*}، غلامعباس دهقانی^۲

۱. گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران

۲. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز

پذیرش: ۲۲ اسفند ۹۲

دریافت: ۲۵ آبان ۹۲

چکیده

مقدمه: پرفشاری شریانی یکی از علل سکتة مغزی بوده و بعنوان یکی از شرایط سمیت عروقی باعث تشدید عوارض سکتة می شود. هدف مطالعه حاضر این بود تا اثر در معرض بودن مغز به پرفشاری بر آسیب‌های ناشی از ایسکمی/خونرسانی مجدد را بررسی کرده و تاثیر پرفشاری کوتاه- مدت بر پاتوژنز سکتة را مورد مطالعه قرار دهد.

روش‌ها: آزمایش با سه گروه از موش‌های صحرایی انجام شد (N=۳۶): شاهد، کنترل ایسکمی/پرفشار. پرفشاری با روش کوآرکتاسیون آئورت شکمی انجام گردید و بعد از ۸ روز موشها جهت القاء ایسکمی با انسداد شریان میانی مغز (MCAO) بمدت ۶۰ دقیقه و بدنال آن ۱۲ ساعت خونرسانی مجدد به صورت تصادفی انتخاب شدند. موشها تحت بیهوشی عمیق برای اندازه گیری حجم ضایعه با روش TTC یا نفوذ پذیری سد خونی - مغزی (BBB) با تکنیک خروج اونس بلو کشته شدند.

یافته‌ها: در موشهای پرفشار، اندازه فشار شریانی بیشتر از ۳۶ درصد افزایش داشت و جریان خون ناحیه ایسکمی در گروههای ایسکمی نسبت به شاهد ۸۰ درصد کاهش یافت. القاء MCAO باعث ایجاد ضایعه در نواحی بزرگی از نیمکره راست در گروه پرفشار در مقایسه با حیوانات سالم گردید و افزایش حجم ضایعه بین گروههای ایسکمی در ناحیه ساب-کورتکس در آنالیز آماری معنی دار بود ($3.139 \pm 2.25 \text{ mm}^3$ vs 2.36 ± 4.3). همچنین MCAO باعث افزایش خروج اونس بلو در حیوانات پرفشار ($9/48 \pm 2/03 \mu\text{g/g}$) بیشتر از حیوانات بدون پرفشاری گردید ($5/09 \pm 1/41 \mu\text{g/g}$).

نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد پرفشاری کوتاه-مدت باعث تشدید ضایعه ایسکمی/خونرسانی مجدد مغز می‌شود. همچنین این نوع پرفشاری باعث تشدید آسیب در عملکرد BBB و افزایش بیشتر در نفوذپذیری عروق مغز بدنال ایسکمی مغزی می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: ضایعه ایسکمی/خونرسانی مجدد، پرفشاری شریانی، نفوذپذیری عروق، ضایعه مغزی

مقدمه

مدت با آسیب رساندن به عروق کلیه، قلب و مغز، نارسایی‌های خطرناکی از جمله افزایش احتمال سکتة را در پی دارد به طوری که حدود ۷۰ درصد افراد دچار سکتة مغزی دارای فشار خون بالا هستند [۱۱، ۱۲]. پرفشاری شریانی در موارد حاد می‌تواند منجر به بروز سکتة و یا خونریزی مغزی شده و در حالت مزمن از طریق ایجاد تغییرات در دیواره عروقی سبب آسیب در مغز می‌شود [۱۲]. بر پایه مطالعات موجود آسیب مغزی ناشی از پرفشاری شریانی مزمن می‌تواند از طریق مکانیسم هیپوکسی-ایسکمی ایجاد شود که با ایجاد تغییراتی

پرفشاری شریانی از شایع‌ترین علل بیماریهای قلبی - عروقی بوده و میزان شیوع آن با عواملی مختلفی همچون سن، نژاد و تغذیه در ارتباط است [۱۱]. این بیماری در دراز

* نویسنده مسئول مکاتبات:

Mohammadi.mohammadt@yahoo.com

Mohammadimohammadt@bmsu.ac.ir

www.phypha.ir/ppj

وبگاه مجله:

و حاد فشار خون همراه است، پرفشاری شریانی از طریق گشاد کردن غیر فعال عروق مکانیسم خودتنظیمی را مختل نموده و با افزایش جریان خون مغز و بالابردن فشار مویرگی منجر به آسیب سد خونی-مغزی و ادم می شود [۶]. همچنین در آنسفالوپاتی ناشی از پرفشاری شریانی حاد افزایش فشار خون مغز خارج از محدوده خودتنظیمی بوده و در نتیجه با شکسته شدن سد خونی-مغزی، ادم مغزی ایجاد شده که در نهایت به کاهش جریان خون مغز منجر می شود [۲۳]. با این حال در ارتباط با بروز شدت آسیب‌های ناشی از ایسکمی مغز در دوره‌های کوتاه-مدت و حاد پرفشاری شریانی هنوز مطالعه-ای صورت نپذیرفته است هرچند تاثیر افزایش فشار خون گذرا بر میزان ضایعه ایجاد شده کاملاً مشخص گردیده است. بر این اساس مطالعه حاضر در نظر داشت تا اثرات پرفشاری شریانی حاد و کوتاه-مدت ناشی از تنگی آئورت شکمی را بر جریان خون مغز، نفوذپذیری عروق مغز و ضایعه مغزی ناشی از ایسکمی موقتی-موضعی به دنبال یک دوره کوتاه-مدت و حاد پرفشاری شریانی را در مغز موش صحرایی بررسی نماید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از موش‌های صحرایی نر نژاد Sprague-Dawley تهیه شده از حیوان خانه دانشگاه علوم پزشکی شیراز با محدوده وزنی ۲۸۰-۳۲۰ 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 تابع شرایط رطوبتی هوای آزاد، درجه حرارت $22 \pm 2^\circ\text{C}$ و با دسترسی آزاد به آب و غذا در طی دوره آزمایش نگهداری می شدند.

جهت القاء پرفشاری شریانی حاد و کوتاه-مدت از روش تنگی آئورت شکمی^۳ استفاده گردید [۱۷]. برای انجام این کار بعد از بیهوش کردن حیوان با ترکیب کتامین (۱۰۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) سمت چپ شکم تراشیده و کاملاً ضد عفونی می شد. با باز کردن شکم در ناحیه سمت چپ و کنار

در دیواره شریانهای مغز بویژه افزایش ضخامت دیواره و کاهش قطر داخلی آنها، بافت مغز را در معرض کاهش جریان خون قرار می دهد [۵]. این در حالی است که در پرفشاری شریانی حاد شریانهای مغز به صورت غیر فعال گشاد شده و با افزایش جریان خون مویرگی و بالابردن فشار آنها احتمال پاره شدن و خونریزی مغزی را افزایش می دهد [۱۵]. بنابراین تاثیرات پرفشاری شریانی حاد بر عروق مغزی متفاوت از مکانیسم پرفشاری شریانی مزمن بوده و در ارتباط با مکانیسم اثرات آن بر آسیب‌های مغزی هنوز ابهامات زیادی وجود دارد. پرفشاری شریانی مزمن یکی از فاکتورهای مهم خطر ساز برای اختلالات مغزی-عروقی بوده و بیشتر بیماران سکته مغزی به صورت کلینیکی حد بالایی از آرتریواسکلروز را که توسط بالا رفتن فشار خون ایجاد شده نشان می دهند [۹]. در این افراد ساختمان عروق مغز، مکانیسم خودتنظیمی جریان خون مغز، میزان آسیب بافتی، واکنشهای ناشی از ایسکمی و پاسخهای درمانی در مقایسه با افراد سالم تفاوت بارزی وجود دارد [۱۴]. تحقیقات نشان داده که پرفشاری شریانی از طریق آسیب رساندن به اندوتلیوم عروق مغز به مرور زمان منجر به وقوع سکته مغزی شده و یا حتی سبب آسیب و یا تخریب بافت مغز می شود [۱۲]. در مدل‌های حیوانی با پرفشاری شریانی مزمن مانند حیوانات SHR^۱ و SHRSP^۲ که در آنها تاثیرات پرفشاری شریانی به عنوان یک فاکتور تشدید کننده سکته مغزی مطرح است، بررسی‌ها نشان داده که در ساختمان و عملکرد عروقی مغز این حیوانات تغییراتی صورت گرفته است [۷، ۲۷]. هر چند برخی از پاسخهای متفاوت در این حیوانات به تغییرات ایجاد شده در جریان خون مغز نسبت داده شده، ولی مطالعات پیشنهاد می کنند که این تغییرات در نورون‌ها و سایر سلول‌های بافت عصبی استعداد ذاتی آنها را به آسیب دیدن بیشتر در پاسخ به القاء ایسکمی را تشدید می کند [۲۴، ۲۵]. گرچه مکانیسم‌هایی که در آسیب مغزی در پرفشاری شریانی حاد و مزمن دخالت دارند متفاوت است ولی وجه مشترک بین آنها وجود آسیب شدید عروقی می باشد. برای نمونه در بیماری مسمومیت حاملگی که با افزایش سریع

1. Spontaneously hypertensive rats

2. Stroke-prone spontaneously hypertensive rats

3. Abdominal aortic coarctation

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 از حرکت و یا جابجائی پروب جلوگیری شود. بر اساس تجربه و منابع محل قرار گرفتن پروب طوری انتخاب شد که همزمان با انسداد شریان میانی مغز میزان جریان خون آن ناحیه تا حدود ۸۵-۷۵ درصد نسبت به قبل از انسداد کاهش یابد [۱۰]. 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 به کمک ترانسیدوسر فشار و اتصال آن به دستگاه Power Lab (AD instrument, model; ML786, Australia) فشار شریانی نیز اندازه گیری و ثبت گردید.

برای آماده سازی حیوان جهت ایجاد ایسکمی موقتی - موضعی مغز از روش ارائه شده توسط Longa و همکاران استفاده گردید [۱۳]. بعد از تثبیت حیوان بر روی میز جراحی، ناحیه گردن از وسط باز شده و بافت همبند و عضلات را کنار زده تا امکان دسترسی آسان به شریان کاروتید مشترک و شاخه های آن (خارجی و داخلی) فراهم گردد. در گروه های 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 (شماره ۳-۰) که نوک آن توسط حرارت گرد شده و سطح آن با پلی ال-لیزین پوشانده شده را از راه شکاف وارد شریان داخلی و از آنجا به آرامی به داخل مجامه 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، شدیداً کاهش پیدا می کرد. بعد از اطمینان از قطع و یا 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. برای خاتمه ایسکمی و خونرسانی مجدد، با مشاهده منحنی لیزر داپلر، نخ نایلون به آرامی از رگ در آورده و با بستن شریان خارجی زخم های ایجاد شده در ناحیه گردن را بخیه زده و حیوان تا بهوش آمدن در محل گرم نگهداری

زدن سایر بافت ها و احشاء شکم، آئورت شکمی را در بالای دو شریان کلیه راست و چپ از بافت های اطراف پاک سازی نموده و برای ایجاد تنگی مناسب با کمک نخ جراحی آماده می شد. در این مرحله در بالای محل جدا شدن شریان های کلیوی، آئورت شکمی به اندازه مورد نظر تنگ می گردید. میزان تنگی آئورت شکمی توسط یک سروسوزن شماره G-۲۳ که قبلاً برای این کار آماده شده بود تعیین می گردید. بدین صورت که ابتدا سروسوزن به طور موازی با شریان آئورت شکمی قرار داده شده و با استفاده از نخ سیلک ۳-۰ گره محکمی ایجاد می گردید، به طوری که جریان خون به طور کامل قطع شود. سپس نیدل با دقت و به آرامی از وسط گره خارج می گردید. بر اساس تجربه، تنگی حدوداً بالای ۹۰ درصد با این روش ایجاد می شد و جریان خون اندام های تحتانی تا حدی که نکروز بافتی ایجاد نشود کاهش می یافت. بعد از حصول اطمینان از انسداد نسبی آئورت شکمی، کمی پودر پنی سیلین G- در محل جراحی پاشیده شده و ناحیه باز شده توسط نخ بخیه دوخته و حیوان تا خاتمه بیهوشی در یک محیط گرم نگهداری می شد. سپس حیوان به محل نگهداری خود برگردانده می شد. در پایان ۱۰ روز جهت حصول اطمینان از ایجاد پرفشاری شریانی بعد از بیهوشی کاروتید مشترک کانول گذاری می گردید و فشار خون شریانی از طریق شریان کاروتید اندازه گیری می شد.

برای آماده سازی حیوان جهت ثبت جریان خون ناحیه ایسکمی مغز و فشار خون شریانی، حیوان با تزریق داخل صفاقی کلرال هیدرات (۴۰۰ mg/kg) بیهوش می گردید. همزمان با تزریق سولفات آتروپین (۵ mg/kg) ترشحات مجاری تنفسی کاهش داده شد تا حیوان طی جراحی و دوره آزمایش با مشکل تنفسی مواجه نشود. برای ثبت جریان خون ناحیه ای مغز (rCBF) از دستگاه لیزر داپلر فلومتری (AD instrument, model; ML191, Australia) استفاده می گردید. برای انجام این کار ابتدا ناحیه بین گوش و چشم راست تراشیده و با برش دادن پوست و کنار زدن عضله تمپورالیس و سطح استخوان تمیز گردیده و پروپ لیزر داپلر مستقیماً بر روی استخوان مجامه قرار داده می شد. بعد از

1. Regional cerebral blood flow

گرفته و تنگی آئورت شکمی در بالای شریان‌های دو کلیه صورت گرفت. کلیه اعمال جراحی و مراحل ایجاد ایسکمی/خون‌رسانی مجدد مشابه گروه ۲ تکرار می‌گردید. در حیواناتی که زنده می‌ماندند ارزیابی اختلالات عصبی-حرکتی ۱۲ ساعت بعد از شروع مرحله خون‌رسانی مجدد انجام گردیده و همانند گروه ۲ حیوانات این گروه به صورت تصادفی در دو زیرگروه وارد می‌شدند.

در حیواناتی که تا ۱۲ ساعت بعد از پایان دوره ایسکمی زنده می‌ماندند اختلالات عصبی-حرکتی با بکارگیری تست پنج نمره ای مورد ارزیابی قرار می‌گرفت [۱۹، ۲۰]. در این تست به صورت قراردادی اختلالات عصبی-حرکتی حیوان به شرح زیر از نمره ۱ تا ۵ درجه بندی شده است. نمره ۱ به حیواناتی داده می‌شد، از جمله حیوانات گروه شاهد، که هیچگونه اختلال حرکتی نشان نمی‌دادند. نمره ۲ برای حیوانی در نظر گرفته می‌شد که دست سمت مقابل نیمکره ایسکمی شده (دست چپ) را موقع آویزان شدن از دم خم می‌نمودند (حالت Flexion). نمره ۳ به حیوانی تعلق می‌گرفت که در شروع حرکت در یک سطح صاف به سمت متقابل نیمکره ایسکمی شده (سمت چپ) می‌چرخید و حیوانی که رفلکس ایستادن (Righting reflex) را از دست داده بودند نمره ۴ و در نهایت نمره ۵ به حیواناتی داده می‌شد که فاقد هر گونه حرکت خودبخودی بودند.

جهت اندازه گیری حجم ضایعه مغزی در نیمکره ایسکمی شده مغز خارج شده از مجسمه را برای سخت شدن به مدت ۵ دقیقه در نرمال سالین ۴ درجه قرار داده و سپس با استفاده از Brain Matrix شش برش عرضی (coronal) به قطر ۲ میلی‌متر تهیه و برش‌ها جهت رنگ آمیزی به مدت ۲۰ دقیقه در محلول ۲ درصد تری فنیل تترازولیوم کلراید (TTC) گذاشته می‌شدند [۲۶]. در این روش رنگ آمیزی، ناحیه ایسکمی شده مغز به رنگ سفید و نواحی سالم به رنگ قرمز آجری در می‌آید. برش‌های رنگ شده را جهت تثبیت شدن به مدت ۲۴ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد بافر شده قرار داده و بعد از آماده سازی نهایی، از هر شش برش بطور جداگانه توسط دوربین دیجیتالی (Cannon, Japan) عکس گرفته و با استفاده از کامپیوتر و نرم افزار مخصوص (NIH image Analyzer) سطح ناحیه ضایعه دیده قسمت

می‌شد. در تمام دوره آزمایش تا خاتمه بیهوشی درجه حرارت حیوان با کمک لامپ گرم کننده در محدوده ۳۸-۳۷ درجه سانتیگراد ثابت نگه داشته می‌شد. بعد از هوشیاری کامل، حیوان را به قفس منتقل نموده و تا انجام آزمایشهای بعدی در شرایط مناسب نگهداری می‌شد.

پروتکل و گروه‌های آزمایشی در این طرح به صورت زیر انجام شد و حیوانات مورد نظر به صورت تصادفی در ۳ گروه به شرح زیر قرار گرفتند:

۱- گروه شاهد (Sham, n=۱۲): حیوانات این گروه در روز اول تحت جراحی شکم (جهت القاء کوآرکتاسیون آئورت شکمی) قرار گرفته اما تنگی آئورت شکمی انجام نشد. در حیوانات این گروه بعد از پایان ۸ روز، عمل جراحی جهت گذاردن پروب لیزر داپلر در سطح مجسمه و آشکارسازی شریان کاروتید مشترک و شریانهای کاروتید خارجی و داخلی در ناحیه گردن انجام شده ولی عمل انسداد شریان میانی مغز صورت نمی‌پذیرفت. با توجه به عدم انسداد شریان میانی مغز، بعد از آماده سازی و رنگ آمیزی برش‌های مغز هیچگونه علائم حاکی ایسکمی مغزی مشاهده نشد.

۲- گروه کنترل ایسکمی/خون‌رسانی مجدد (I/R, n=۱۲): حیوانات این گروه در روز اول تحت جراحی شکم (جهت القاء کوآرکتاسیون آئورت شکمی) قرار گرفته اما تنگی آئورت شکمی انجام نشد. کلیه اعمال جراحی تا مرحله القاء ایسکمی مشابه گروه شاهد می‌باشد. القاء ایسکمی به مدت ۶۰ دقیقه دوام پیدا می‌کرد و 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 می‌شد. ارزیابی اختلالات عصبی-حرکتی ۱۲ ساعت بعد از شروع مرحله خون‌رسانی مجدد در حیواناتی که زنده می‌ماندند انجام می‌گردید. سپس تحت بیهوشی عمیق، با تزریق داخل صفاقی تیوپنتال سدیم، حیوان را کشته، سر را جدا کرده، مغز را با احتیاط کامل از مجسمه خارج نموده و جهت بررسی حجم ضایعه مغزی و میزان نفوذپذیری سد خونی-مغزی در دو زیر گروه آماده سازی می‌شدند.

۳- گروه پرفشار ایسکمی/خون‌رسانی مجدد (HTN+I/R, n=۱۲): حیوانات این گروه در روز اول تحت جراحی شکم (جهت القاء کوآرکتاسیون آئورت شکمی) قرار

جدول ۱- مقادیر پارامترهای خون شریانی قبل و در زمان انسداد شریان میانی مغز و همچنین در اوایل مرحله خونرسانی مجدد در حیوانات ایسکمی شده و در زمان معادل در حیوانات شاهد.

Groups	Before ischemia			During ischemia			Reperfusion		
	Sham	IR	HTN+IR	Sham	IR	HTN+IR	Sham	IR	HTN+IR
Parameters									
pH_a	7.413 ±0.003	7.410 ±0.000	7.393 ±0.012	7.390 ±0.000	7.397 ±0.003	7.390 ±0.010	7.396 ±0.003	7.396 ±0.003	7.393 ±0.012
P_aCO₂ (mmHg)	38±1	37±2	37±1	35±2	37±1	38±1	40±1	39±1	36±1
P_aO₂ (mmHg)	81±1	80±1	78±1	83±1	83±6	79±2	82±1	81±1	84±1

داده‌ها به صورت Means±SEM نمایش داده شده است.

منحنی استاندارد غلظت‌های اونس بلو محاسبه شده و نتایج بر حسب میکروگرم به گرم ($\mu\text{g/g}$) وزن بافت مغز بیان شد. نتایج بدست آمده در این تحقیق به صورت میانگین±خطای استاندارد میانگین (Mean±SEM) ارائه شده است. برای مقایسه داده‌ها بین گروه‌های مختلف از روش مقایسه ای غیر پارامتریک (Nonparametric) و تست آماری Mann-Whitney U test استفاده گردید و در تمامی مقایسه‌ها $P < 0.05$ به عنوان اختلاف معنی دار تلقی گردید.

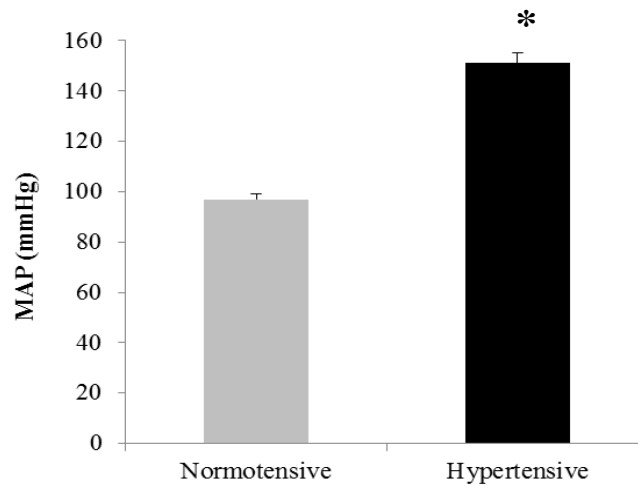
یافته‌ها

مقادیر پارامترهای خون شریانی شامل پی اچ (pH_a)، فشار اکسیژن (P_aO_2 , mmHg) و فشار دی اکسید کربن (P_aCO_2 , mmHg) در گروه‌های آزمایشی در جدول ۱ نشان داده شده است. پارامترهای فوق در حیوانات ایسکمی شده قبل از انسداد شریان میانی مغز، در طی ۶۰ دقیقه زمان انسداد و ۱۵ دقیقه بعد از شروع مرحله خونرسانی مجدد و در حیوانات گروه شاهد از نظر تجزیه تحلیل آماری داده‌ها هیچگونه تفاوت معنی داری را نشان نمی‌دهند.

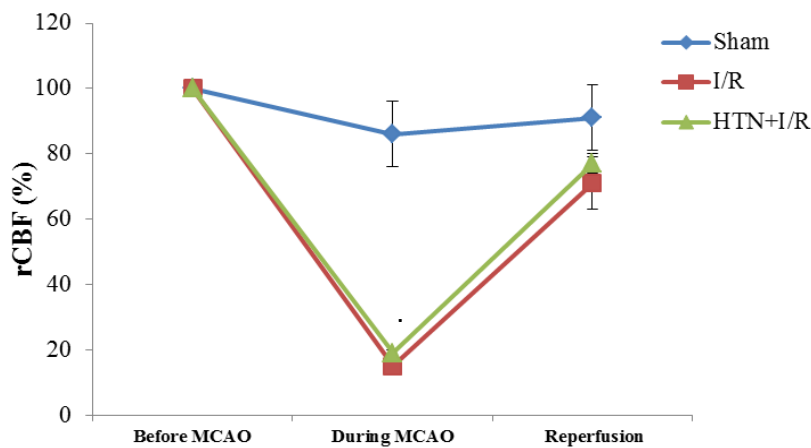
میانگین متوسط فشار خون شریانی در حیوانات با فشار خون طبیعی و پرفشار شریانی در شکل ۱ آمده است. مقایسه آماری این داده‌ها در پایان ۱۰ روز تنگی آنورت شکمی تفاوت معنی داری را نشان داد. به طوری که تنگی آنورت سبب افزایش فشار خون شریانی به میزان ۳۶ درصد در حیوانات پرفشار در مقایسه با گروه حیوانات با فشار طبیعی شده است. میزان فشار خون شریانی در حیوانات با فشار خون طبیعی و پرفشار شریانی به ترتیب 97 ± 2 و 151 ± 4 میلی متر جیوه بود.

کورتکس و استریاتوم با روش ارائه شده در مطالعات قبلی حجم ایسکمی مغز محاسبه می‌گردید [۱۸].

بررسی آسیب و نفوذپذیری سد خونی-مغزی به صورت کمی و با استفاده از تکنیک خروج اونس بلو از عروق انجام می‌گردید [۳]. در این روش محلول اونس بلو به صورت داخل وریدی (1 ml/kg از محلول ۲ درصد، ۳۷ درجه) به مدت ۵ دقیقه به آرامی تزریق می‌شد. بعد از ۱۲ ساعت حیوان را بیهوش کرده و با باز کردن قفسه سینه یک کانول در داخل بطن چپ قرار داده و 300 ml نرمال سالین گرم به طور آهسته تزریق می‌شد. بعد از خاتمه شستشو سر حیوان را جدا کرده و مغز به آرامی و بدون ایجاد آسیب از جمجمه خارج شده و پس از جدا کردن ساقه مغز، مخچه و پیاز بویایی توسط ماتریکس مغزی به دقت و از طریق شکاف طولی به دو نیمکره راست (ضایعه دیده) و چپ (سالم) تقسیم می‌گردید. سپس وزن دو نیمکره با دقت توسط ترازوی دیجیتالی اندازه گیری شده و هر نیمکره را با اضافه کردن $2/5 \text{ ml}$ محلول بافر شده فسفات توسط دستگاه هموژنایزر به طور کامل هموژنیزه کرده و سپس به محلول هموژنیزه شده $2/5$ میلی لیتر اسید تری کلرواستیک ۶۰ درصد اضافه شده و به مدت ۲ دقیقه با دستگاه ورتکس به طور کامل مخلوط شد. سپس نمونه حاصل به مدت ۱۰ دقیقه خنک شده و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ (دور 3500 rpm یا 1640 g) می‌گردید. نمونه‌ها دوباره به مدت ۱۰ دقیقه خنک شده و قسمت فوقانی آنها جهت اندازه گیری جذب نوری اونس بلو جدا شده و سپس با دستگاه اسپکتوفوتومتر شدت جذب نور محلول مورد آزمایش (UV 7500, Spectro lab: England) در طول موج نور آبی (610 nm) مشخص می‌شد. به طور همزمان و با کمک



شکل ۱- تغییرات متوسط فشار خون شریانی (Mean Arterial Pressure, MAP) بعد از گذشت ۸ روز از تنگی آئورت شکمی. داده‌ها به صورت Means±SEM نشان داده شده است. * نشانگر تفاوت معنی دار با $P < 0.05$ در مقایسه با گروه حیوانات دارای فشار خون طبیعی.



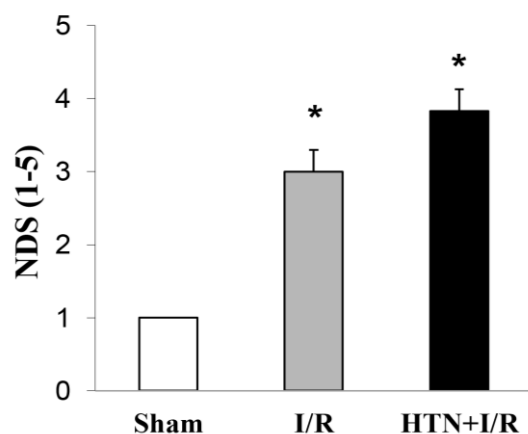
شکل ۲- جریان خون ناحیه ایسکمی (Regional cerebral blood flow, rCBF) بر پایه درصد جریان خون پایه (% from baseline) قبل، حین، و بعد از انسداد شریانی میانی مغز (MCAO) در نیمکره راست گروه شاهد (Sham) و ۱۲ ساعت بعد از خونرسانی مجدد در نیمکره ایسکمی شده گروه با فشار خون طبیعی (I/R) و پرفشار شریانی (HTN+I/R). داده‌ها به صورت Means±SEM نشان داده شده است. * نشانگر تفاوت معنی دار با $P < 0.05$ با گروه شاهد و داده های قبل از انسداد شریانی میانی مغز

مجدد از نظر آماری تفاوت قابل ملاحظه وجود داشته باشد، بالا رفت.

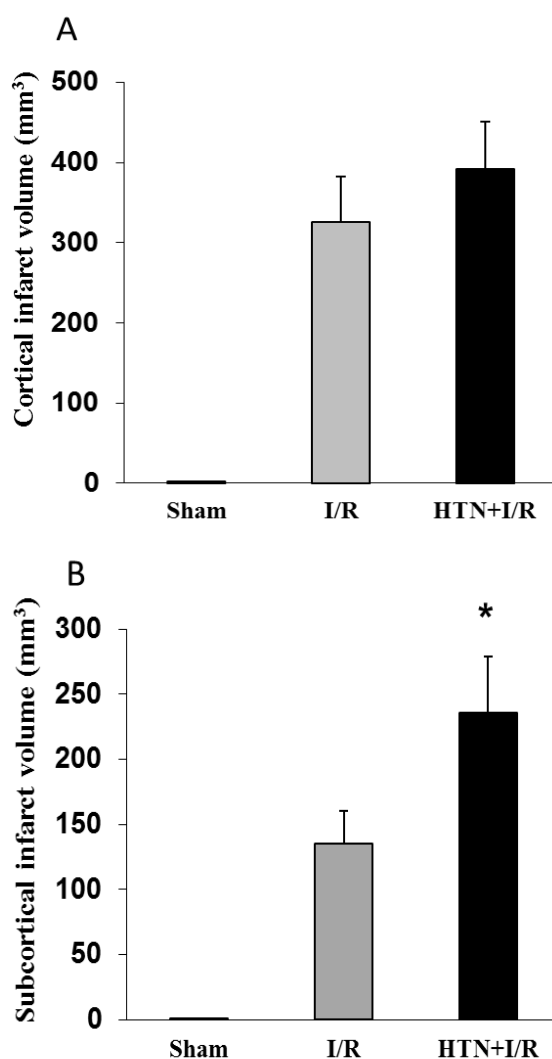
نتایج حاصل از بررسی اختلالات عصبی-حرکتی در تمامی گروهها در شکل ۳ نشان داده شده‌اند. در حیوانات گروه شاهد هیچگونه اختلالات عصبی-حرکتی وجود نداشت و میزان عددی آن یک از ۵ بود. اما مقادیر عددی این اختلالات برای گروه I/R $3/0 \pm 0/3$ ، و برای گروه HNT+I/R $3/8 \pm 0/3$ از ۵ بودند، که بین دو گروه از لحاظ آماری تفاوت معنی داری وجود نداشت.

مقادیر کمی حجم ضایعه مغزی (بر حسب mm^3) در نیمکره راست گروههای ایسکمی به صورت مجزا در کورتکس

تغییرات جریان خون ناحیه ثبت شده توسط لیزر داپلر در طی ۱۵ دقیقه قبل از انسداد شریانی میانی مغز، ۶۰ دقیقه دوره ایسکمی و ۱۵ دقیقه اول خونرسانی مجدد سه گروه در شکل ۲ نمایش داده شده است. همان طوری که شکل مشخص می کند با انسداد شریانی میانی مغز جریان خون ناحیه ایسکمی گروههای ایسکمی (I/R, HTN+I/R) که بطور طبیعی از این شریان مشروب می شدند، حدود ۸۰ درصد کمتر از زمان قبل ایجاد ایسکمی بوده و در طول ۶۰ دقیقه دوره انسداد تغییر قابل ملاحظه ای بین آنها مشاهده نگردید. بعد از باز کردن شریان میانی مغز جریان خون در دو گروه ایسکمی به سرعت و تا حد قبل از انسداد، بدون آنکه بین میانگین آنها در زمان خونرسانی



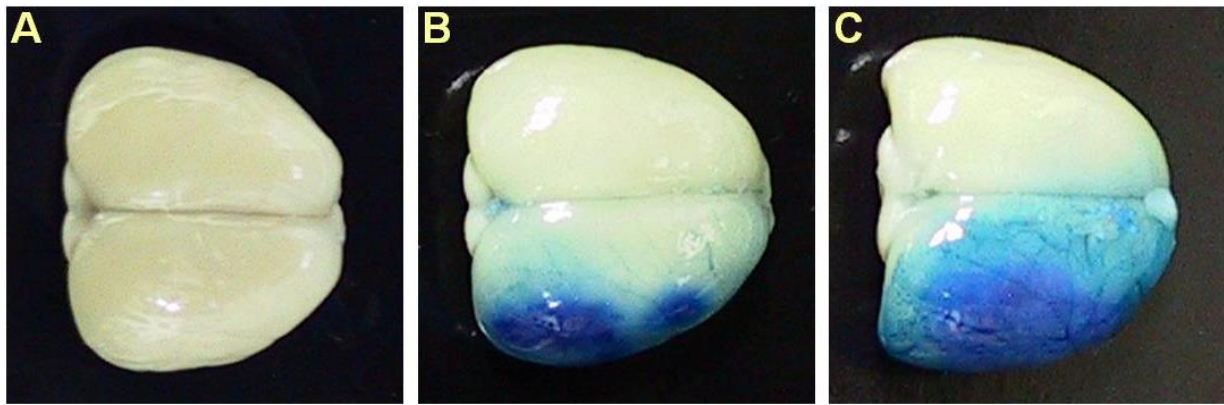
شکل ۳- اختلالات عصبی- حرکتی (Neurological deficit score, NDS) ۱۲ ساعت بعد از خونرسانی مجدد. داده‌ها به صورت $\text{Means} \pm \text{SEM}$ نشان داده شده است. * نشانگر تفاوت معنی دار با $P < 0.05$ در مقایسه با گروه شاهد



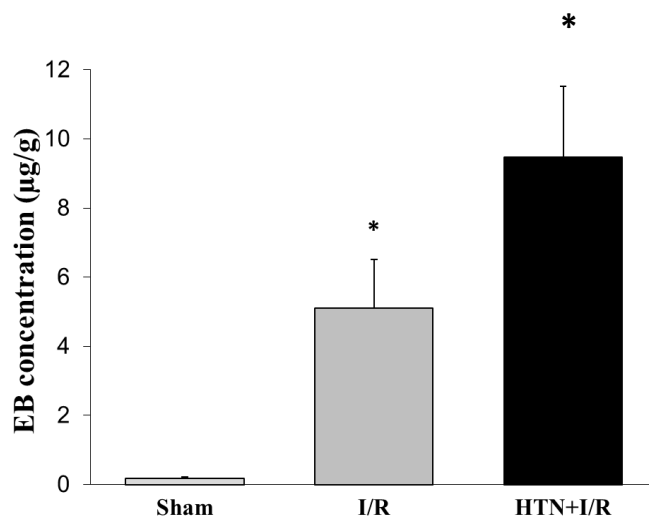
شکل ۴- اثرات دوره های کوتاه مدت و حاد فشار خون بر روی حجم ضایعه مغزی ۱۲ ساعت بعد از خونرسانی مجدد به طور مجزا در کورتکس (A) و استریاتوم (B). داده ها به صورت $\text{Means} \pm \text{SEM}$ نشان داده شده است. * نشانگر تفاوت معنی دار با $P < 0.05$ در مقایسه با گروه I/R

در کورتکس و استریاتوم به ترتیب $326 \pm 56 \text{mm}^3$ و $135 \pm 25 \text{mm}^3$ بود. مقادیر کمی حجم ضایعه مغزی در گروه

(A) و ساب کورتکس (B) در شکل ۴ نشان داده شده است. در گروه کنترل ایسکمی (I/R) حجم ضایعه مغزی ایجاد شده



شکل ۵- فوتوگراف تهیه شده از مغز با رنگ آمیزی به روش خروج اونس بلوی بافتی در گروه شاهد (A) و ۱۲ ساعت بعد از خونرسانی مجدد در حیوانات با فشار خون طبیعی (B) و پرفشار شریانی (C). نواحی آبی رنگ نشان دهنده مناطق آسیب دیده و مناطق سفید نشان دهنده نواحی سالم مغز می باشد.



شکل ۶- میزان خروج اونس بلو از عروق مغز (µg/g) در نیمکره راست گروه شاهد (Sham) و ۱۲ ساعت بعد از خونرسانی مجدد در نیمکره ایسکمی شده گروه با فشار خون طبیعی (I/R) و پرفشار شریانی (HTN+I/R). داده ها به صورت Means±SEM نشان داده شده است. * نشانگر تفاوت معنی دار با P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه شاهد، # نشانگر تفاوت معنی دار با P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه I/R

تجمع پیدا کرده آن را به رنگ آبی درآورده است. در حیوانات گروه شاهد به دلیل عدم وجود ضایعه ایسکمی رنگ هر دو نیمکره مغزی به صورت کاملاً سفید و بی رنگ است (تصویر A). در حیوانات گروه کنترل ایسکمی در نیمکره ضایعه دیده رنگ آبی به خوبی دیده می شود (تصویر B) که خود دلیلی بر آسیب سد خونی- مغزی است. گستردگی بیشتر رنگ آبی در نیمکره راست گروه پرفشار ایسکمی شده در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی گویای این واقعیت است که این آسیب تشدید شده است (تصویر C).

میزان کمی تجمع اونس بلو در بافت مغز بر حسب میکروگرم به گرم (µg/g) بافت مغز برای نیمکره ضایعه دیده (راست) به صورت مجزا در شکل ۶ نشان داده شده است.

پرفشار ایسکمی شده (HTN+I/R) معادل با $3.92 \pm 0.59 \text{ mm}^3$ در کورتکس و $2.36 \pm 0.43 \text{ mm}^3$ در ساب کورتکس می باشند. گرچه مقادیر آنها به ظاهر از گروه NTN+I/R بیشتر هستند، ولی تنها میزان حجم ضایعه در ساب کورتکس بین دو گروه ایسکمی شده از لحاظ تجزیه و تحلیل آماری معنی دار بود ($P < 0.05$).

شکل ۵ تصاویر مغز موش های صحرایی تهیه شده با رنگ آمیزی به روش خروج اونس بلوی بافتی در گروه شاهد (A) و ۱۲ ساعت بعد از خونرسانی مجدد در حیوانات با فشار خون طبیعی (B) و پرفشار شریانی (C) را نشان می دهد. در این تصاویر نواحی سالم مغز سفید رنگ بوده ولی چون در نواحی آسیب دیده اونس بلوی خارج شده از رگ در بافت

با حیوانات بدون پرفشار افزایش یافت (شکل ۱). بر اساس مطالعات اخیر دوره های کوتاه-مدت پرفشاری شریانی باعث افزایش تولید برخی از عوامل مخرب سیستم عصبی در مغز می شود که از جمله این تغییرات می توان به مطالعه Pauolt اشاره نمود که در این تحقیق ایجاد پرفشاری شریانی حاد تولید رادیکال های آزاد اکسیژن را به شدت در مغز این حیوانات افزایش داده و باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در مغز این حیوانات شده است [۲۱]. همچنین نتایج برخی مطالعات دیگر نشان می دهد میزان تولید نیتریک اکساید در مغز در زمان پرفشاری شریانی حاد افزایش پیدا می کند [۲, ۲۲]. با این حال نتایج مطالعات پرفشاری مزمن کاملاً متفاوت از نتایج بدست آمده از دوره های پرفشاری حاد یا کوتاه-مدت است. برای نمونه تغییرات پاتولوژیکی نظیر آرتریواسکلروز، تغییرات دیواره عروق و کاهش جریان خون مغز که در پرفشاری شریانی مزمن دیده می شوند در پرفشاری شریانی حاد اتفاق نمی افتد [۷, ۹]. نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد این مدل پرفشاری در ایسکمی مغزی ضایعات بیشتری را بوجود می آورد. همان طور که در نمودارهای حجم ضایعه مغزی نشان داده شده القاء ایسکمی در حیوانات مبتلا به پرفشاری شریانی حاد به طور واضح حداقل حجم ضایعه ساب کورتکس را به طور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی افزایش داده است (شکل ۴). این نتایج بدست آمده با نتایج مطالعات انجام شده در حیوانات با پرفشاری مزمن کاملاً همسو بوده و القاء ایسکمی/خونرسانی مجدد ضایعات مغزی بیشتری در این حیوانات ایجاد کرده است [۱]. همچنین نتایج این تحقیق با نتایج مطالعه دیگری که القاء پرفشاری شریانی به صورت کوتاه مدت با مهار تولید نیتریک اکساید حجم ضایعه مغز در پاسخ به ایسکمی موضعی را افزایش داده همسو است [۲۴]. با توجه به نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر و نتایج مطالعاتی که ارائه گردید می توان این نتیجه گیری را ارائه کرد که در دوره های پرفشاری شریانی حاد و کوتاه-مدت برخی از فاکتورهای مخرب عصبی-عروقی مانند رادیکال های آزاد اکسیژن و نیتروژن در مغز افزایش یافته و این فاکتورها با تغییراتی که در سیستم عصبی-عروقی در بافت مغز در طی پرفشاری ایجاد می کنند ضایعه ناشی از ایسکمی/خونرسانی مجدد را تشدید می کنند.

گروه شاهد غلظت اونس بلوی بافتی بسیار کم بوده و $0.17 \pm 0.04 \mu\text{g/g}$ می باشد. در گروه کنترل ایسکمی غلظت اونس بلو در نیمکره آسیب دیده مغز به شدت بالا رفته $5.09 \pm 1.41 \mu\text{g/g}$ و به طور معنی داری در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت ($P < 0.05$). در گروه پرفشار شریانی غلظت اونس بلو در نیمکره راست گروه HTN+I/R به شدت و به طور معنی دار ($P < 0.05$) در مقایسه با دو گروه شاهد و کنترل ایسکمی افزایش پیدا کرد ($9.48 \pm 2.03 \mu\text{g/g}$)، که خود دلیلی بر تشدید آسیب سد خونی-مغزی بدلیل پرفشاری شریانی می باشد.

بحث

پرفشاری شریانی تغییرات گسترده ای در بافت های مختلف بدن از جمله بافت مغز ایجاد نموده و بر پایه نتایج برخی از مطالعات بروز سکتته مغزی در افرادی که دچار پرفشاری مزمن هستند با صدمات بیشتری همراه بوده است [۱۰, ۱۱]. با این حال گرچه اثرات افزایش فشار خون به صورت گذرا در حین ایسکمی مغزی تاثیرات مشخصی طبق گزارش محققین داشته [۴]، اما تاثیر دوره های کوتاه مدت پرفشاری که در حین برخی حالات بیماری صورت می گیرد کاملاً مشخص نشده است. نتایج بدست آمده از این تحقیق به خوبی نشان می دهد که در معرض قرار دادن مغز در مقابل افزایش فشار خون شریانی با روش کوآرکتاسیون آئورت شکمی باعث تشدید ضایعه ایسکمی در مغز حیوانات پرفشار شده (شکل ۴) و میزان آسیب به اختلالات عصبی-حرکتی در این حیوانات بیشتر است (شکل ۳). همچنین نتایج این تحقیق نشان می دهد آسیب به سد خونی-مغزی به دنبال ایجاد سکتته مغزی در حیواناتی که دچار فشار خون بالاتری بودند بیشتر صورت گرفته است (شکل ۵ و ۶). بنابراین بر پایه نتایج بدست آمده در این تحقیق می توان گفت که دوره های حاد و کوتاه-مدت پرفشاری شریانی باعث تشدید آسیب های ناشی از ایسکمی مغزی می شود.

در این تحقیق جهت القاء پرفشاری شریانی از روش تنگی شدید آئورت شکمی (کوآرکتاسیون آئورت شکمی) در طی ۸ روز استفاده گردید و فشار خون شریانی ۳۶ درصد در مقایسه

سد خونی - مغزی شدیدتر بوده و نفوذپذیری عروقی به طور قابل ملاحظه ای افزایش یافته است (شکل ۵ و ۶). این افزایش نفوذپذیری عروقی در پرفشاری حاد همانند پرفشاری مزمن احتمالاً بواسطه تغییرات پروتئین‌های اتصالات محکم در عروق مغز اتفاق افتاده است و نتایجی که از تحقیق قبلی خود ما انجام گردیده و نتایج آن هنوز چاپ نشده صحت این موضوع را به خوبی تایید می کند.

نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان می دهد دوره های حاد و کوتاه - مدت پرفشاری شریانی ضایعه مغزی به دنبال آسیب های ناشی از ایسکمی / خونرسانی مجدد مغز را تشدید نموده و همچنین با تشدید آسیب در سیستم سد خونی - مغزی باعث افزایش بیشتر نفوذپذیری عروق مغز می شود. بر این اساس می توان این پیشنهاد را ارائه نمود که به دنبال دوره های کوتاه - مدت پرفشاری شریانی، همانند پرفشاری مزمن، افزایش تولید برخی مخرب های بافت عصبی و عروقی در مغز صورت گرفته و این فاکتور های مخرب با تغییر در پاسخ دهی نوروں ها و تغیر در عملکرد طبیعی عروق مغزی باعث تشدید آسیب های ذکر شده می گردد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز که مقدمات و وسائل مورد نیاز این تحقیق را فراهم نموده و همچنین گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله تشکر و قدردانی می شود.

پرفشاری شریانی علاوه بر آسیب به بافت عصبی با ایجاد تغییرات دیواره عروقی، از جمله ضخیم تر شدن دیواره شریان ها و کاهش قطر داخلی در طولانی مدت، منجر به کاهش خونرسانی مغز شده که این کاهش جریان خون به همراه سایر تغییرات عروقی مغز احتمال وقوع سکتة مغزی را تشدید می کند [۵، ۱۵]. مطالعه Lippoldt و همکاران بر روی موشهای صحرایی با مدل SHRSP نشان داده که در طی بروز پرفشاری شریانی تغییراتی در عملکرد سلول های اندوتلیال عروقی مغز قبل از بروز سکتة مغزی ایجاد می شود [۱۲]، به طوری که در این حالت میزان جریان خون و سنتز برخی پروتئین ها در مغز تغییر می کند [۱۶]. پروتئین های اتصالات محکم بین سلول های اندوتلیال عروق مغزی نقش مهمی در حفظ سلامت سد خونی - مغزی و هموستاز سیستم عصبی بر عهده دارند [۲۸]. نتایج بدست آمده از مطالعات پرفشاری شریانی مزمن نشان می دهد که میزان و عملکرد پروتئین های اتصالات محکم و سایر ناقلین سد خونی - مغزی تغییر کرده و با ایجاد ادم مغزی منجر به بروز ضایعات عصبی می شود [۱۲]. از آنجایی که پروتئین های اتصالات محکم نقش مهمی در حفظ ماهیت سد خونی - مغزی و نفوذپذیری آن بر عهده دارند تغییر کمی و یا کیفی این پروتئین ها در شرایط پاتولوژیک به سد خونی - مغزی آسیب رسانده و همراه با تورم آستروسیت ها و سلول های اندوتلیال نفوذپذیری عروقی مغز را افزایش می دهند [۸، ۲۸]. افزایش میزان تجمع اونس بلو در بافت مغز موش های صحرایی گروه پرفشار شریانی ایسکمی شده گویای این واقعیت است که آسیب به

References

- [1] Barone FC, Price WJ, White RF, Willette RN, Feuerstein GZ, Genetic hypertension and increased susceptibility to cerebral ischemia. *Neurosci Biobehav Rev* 16 (1992) 219-233.
- [2] Barton CH, Ni Z, Vaziri ND, Effect of severe aortic banding above the renal arteries on nitric oxide synthase isotype expression. *Kidney Int* 59 (2001) 654-661.
- [3] Belayev L, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD, Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res* 739 (1996) 88-96.
- [4] Chamorro A, Vila N, Ascaso C, Elices E, Schonewille W, Blanc R, Blood pressure and functional recovery in acute ischemic stroke. *Stroke* 29 (1998) 1850-1853.
- [5] De la Torre JC, Alzheimer disease as a vascular disorder: nosological evidence. *Stroke* 33 (2002) 1152-62.
- [6] Euser AG, Cipolla MJ, Cerebral blood flow autoregulation and edema formation during pregnancy in anesthetized rats. *Hypertension* 49 (2007) 334-340.

- [7] Hom S, Fleegal MA, Egleton RD, Campos CR, Hawkins BT, Davis TP, Comparative changes in the blood-brain barrier and cerebral infarction of SHR and WKY rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292 (2007) 1881-1892.
- [8] Jiao H, Wang Z, Liu Y, Wang P, Xue Y, Specific role of tight junction proteins claudin-5, occludin, and ZO-1 of the blood-brain barrier in a focal cerebral ischemic insult. *J Mol Neurosci* 44 (2011) 130-139.
- [9] Johansson BB, Hypertension mechanisms causing stroke. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26 (1999) 563-565.
- [10] Lecrux C, Nicole O, Chazalviel L, Catone C, Chuquet J, MacKenzie ET, Touzani O, Spontaneously hypertensive rats are highly vulnerable to AMPA-induced brain lesions. *Stroke* 38 (2007) 3007-3015.
- [11] Leonardi-Bee J, Bath PM, Phillips SJ, Sandercock PA, Blood pressure and clinical outcomes in the International Stroke Trial. *Stroke* 33 (2002) 1315-1320.
- [12] Lippoldt A, Kniesel U, Liebner S, Kalbacher H, Kirsch T, Wolburg H, Haller H, Structural alterations of tight junctions are associated with loss of polarity in stroke-prone spontaneously hypertensive rat blood-brain barrier endothelial cells. *Brain Res* 885 (2000) 251-261.
- [13] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R, Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20 (1989) 84-91.
- [14] Matsushita K, Kuriyama Y, Nagatsuka K, Nakamura M, Sawada T, Omae T, Periventricular white matter lucency and cerebral blood flow autoregulation in hypertensive patients. *Hypertension* 23 (1994) 565-568.
- [15] Mayhan WG. Regulation of blood brain barrier permeability. *Microcirculation* 8 (2001) 89-104.
- [16] Mies G, Hermann D, Ganten U, Hossmann KA, Hemodynamics and metabolism in stroke-prone spontaneously hypertensive rats before manifestation of brain infarcts. *J Cereb Blood Flow Metab* 19 (1999) 1238-1246.
- [17] Mohammadi MT, Amini R, Jahanbakhsh Z, Shekarforoush S. Effects of atorvastatin on the hypertension-induced oxidative stress in the rat brain. *Iran Biomed J* 17 (2013) 152-157.
- [18] Mohammadi MT, Shid-Moosavi SM, Dehghani GA, Contribution of nitric oxide synthase (NOS) in blood-brain barrier disruption during acute focal cerebral ischemia in normal rat. *Pathophysiology* 19 (2011) 13-20.
- [19] Mohammadi MT, Shid Moosavi SM, Dehghani GA, Contribution of nitric oxide synthase (NOS) activity in blood-brain barrier disruption and edema after acute ischemia/reperfusion in aortic coarctation-induced hypertensive rats. *Iran Biomed J* 15 (2011) 22-30.
- [20] Mohammadi MT, Shid Moosavi SM, Dehghani GA, Inhibition of nitric oxide synthase activity improves focal cerebral damage induced by cerebral ischemia/reperfusion in normotensive rats. *Physiol Pharmacol* 14 (2010) 23-33.
- [21] Poulet R, Gentile MT, Vecchione C, Distaso M, Aretini A, Fratta L, Russo G, Echart C, Maffei A, De Simoni MG, Lembo G, Acute hypertension induces oxidative stress in brain tissues. *J Cereb Blood Flow Metab* 26 (2006) 253-262.
- [22] Qadri F, Arens T, Schwarz EC, Hauser W, Dendorfer A, Dominiak P, Brain nitric oxide synthase activity in spontaneously hypertensive rats during the development of hypertension. *J Hypertens* 21 (2003) 1687-1694.
- [23] Qi X, Inagaki K, Sobel RA, Mochly-Rosen D, Sustained pharmacological inhibition of deltaPKC protects against hypertensive encephalopathy through prevention of blood-brain barrier breakdown in rats. *J Clin Invest* 118 (2008) 173-182.
- [24] 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.
- [25] Sironi L, Guerrini U, Tremoli E, Miller I, Gelosa P, Lascialfari A, Zucca I, Eberini I, Gemeiner M, Paoletti R, Gianazza E, Analysis of pathological events at the onset of brain damage in stroke-prone rats: a proteomics and magnetic resonance imaging approach. *J Neurosci Res* 78 (2004) 115-122.
- [26] Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharp FR, A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow Metab* 10 (1990) 290-293.
- [27] Ueno M, Sakamoto H, Liao YJ, Onodera M, Huang CL, Miyanaka H, Nakagawa T, Blood-brain barrier disruption in the hypothalamus of young adult spontaneously hypertensive rats. *Histochem Cell Biol* 122 (2004) 131-137.
- [28] Wolburg H, Noell S, Mack A, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P, Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res* 335 (2009) 75-96.