

Original Article



Investigation of the Effectiveness of Doxycycline on the Improvement of Oxidative Stress Biomarkers in Patients with Ischemic Stroke

Mojtaba Khazaei¹, Masrour Valdbeighi², Salman Khazaei³, Efat Al-Sadat Mirmoeini⁴, Fereshteh Mehri^{5*}

¹ Department of Neurology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

² General Practitioner, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

³ Autism Spectrum Disorders Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

⁴ Occupational Health and Safety Research Center & Research Center for Health Sciences, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

⁵ Nutritional Health Research Center & Occupational Health and Safety Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Article history:

Received: 22 November 2023

Revised: 08 January 2024

Accepted: 10 February 2024

ePublished: 16 March 2024

*Corresponding author:

Fereshteh Mehri, Nutritional Health Research Center & Occupational Health and Safety Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.

Email:

freshteh_mehri@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: Considering the role of oxidative stress in the pathogenesis of ischemic stroke, antioxidant and anti-inflammatory drugs can be a potential treatment in these patients. This study aimed to investigate the effectiveness of doxycycline on the improvement of oxidative stress biomarkers in patients with ischemic stroke.

Materials and Methods: This clinical trial study was performed on 48 patients with ischemic stroke who had referred to Besat Hospital in Hamadan, Iran, in 2023. They were randomly and equally assigned to the intervention (doxycycline at the rate of 100 mg every 12 hours) and placebo groups for one week. Before and after the intervention, serum levels of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), total oxidant status, total antioxidant capacity, c-reactive protein (CRP), and erythrocyte sedimentation rate (ESR) were measured.

Results: The study groups had no statistically significant difference in all measured biomarkers in the first 24 h after the stroke ($P>0.05$). In both study groups, the biomarkers of MDA and total oxidant status decreased after treatment. This decrease was greater in the intervention group, compared to the placebo group with a statistically significant difference. The total antioxidant capacity and GSH increased in both groups, and this increase was more significant in the intervention group, compared to the placebo group. In both groups, serum levels of CRP and ESR decreased, but no statistically significant difference was observed between the two groups.

Conclusion: Addition of doxycycline to the standard treatment of ischemic stroke patients may reduce oxidative stress biomarkers; however, to confirm the results of this study, studies with a larger sample size are needed.

Keywords: Doxycycline, Ischemic Stroke, Oxidative Stress

Please cite this article as follows: Khazaei M, Valdbeighi M, Khazaei S, Mirmoeini E, Mehri F. Investigation of the Effectiveness of Doxycycline on the Improvement of Oxidative Stress Biomarkers in Patients with Ischemic Stroke. *Avicenna J Clin Med*. 2024; 30(4): 194-201. DOI: 10.32592/ajcm.30.4.194



بررسی اثربخشی داکسیسیکلین بر بهبود بیومارکرهای استرس اکسیداتیو در بیماران مبتلا به استروک ایسکمیک

مجتبی خزایی^۱ , مسرور ولدبیگی^۲، سلمان خزایی^۳، عفت السادات میرمعینی^۴، فرشته مهری^{۵*} 

^۱ گروه نورولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

^۲ دکتری حرفه‌ای پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

^۳ مرکز تحقیقات اختلالات طیف اوتیسم، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

^۴ مرکز تحقیقات بهداشت و ایمنی شغلی و مرکز تحقیقات علوم بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

^۵ مرکز تحقیقات سلامت تغذیه و مرکز تحقیقات بهداشت و ایمنی شغلی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

چکیده

تاریخچه‌ی مقاله:

دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۰۱

ویرایش: ۱۴۰۲/۱۰/۱۸

پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۲۱

انتشار: ۱۴۰۲/۱۲/۲۶

سابقه و هدف: با توجه به نقش استرس اکسیداتیو در پاتوژنز استروک ایسکمیک، داروهای آنتی‌اکسیدانتی و ضدالتهابی می‌تواند درمانی بالقوه در این بیماران باشد. هدف از انجام این مطالعه تعیین اثربخشی داکسیسیکلین بر بهبود بیومارکرهای استرس اکسیداتیو در بیماران مبتلا به استروک ایسکمیک است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی کارآزمایی بالینی، ۴۸ بیمار مبتلا به استروک ایسکمیک مراجعه‌کننده به بیمارستان بعثت همدان در سال ۱۴۰۱ به‌طور تصادفی، به دو گروه مداخله (دریافت‌کننده داکسیسیکلین به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در هر ۱۲ ساعت) و دارونما تقسیم شدند. افراد به مدت یک هفته تحت تماس قرار گرفتند. در ادامه‌ی بررسی، قبل و پس از مداخله، سطح سرمی مالون دی‌آلدئید (MDA)، گلوتاتیون (GSH)، (TOS)، Total Oxidant Status (TAC)، پروتئین واکنشی (CRP) و سرعت رسوب گلوبول قرمز (ESR) اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: هر دو گروه مطالعه در ۲۴ ساعت اول پس از استروک، از نظر همه‌ی بیومارکرها بررسی شدند. تفاوت آماری معنی‌داری وجود نداشت ($P>0/05$). در هر دو گروه مطالعه، بیومارکهای MDA و TOS پس از درمان کاهش پیدا کرد که این کاهش در گروه مداخله با تفاوت آماری معنی‌داری بیشتر بود. TAC و GSH در هر دو گروه افزایش پیدا کرد که این افزایش در گروه مداخله معنی‌دار بود. در هر دو گروه، سطح سرمی ESR و CRP کاهش پیدا کرد؛ اما تفاوت آماری معنی‌داری بین دو گروه مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: اضافه کردن داکسیسیکلین به درمان استاندارد بیماران استروک ایسکمیک ممکن است بیومارکهای استرس اکسیداتیو را کاهش دهد.

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

* نویسنده‌ی مسئول: فرشته مهری، مرکز تحقیقات سلامت تغذیه و مرکز تحقیقات بهداشت و ایمنی شغلی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.
ایمیل: freshteh_mehri@yahoo.com

واژگان کلیدی: استرس اکسیداتیو، داکسیسیکلین، سکتی مغزی ایسکمیک

استناد: خزایی، مجتبی؛ ولدبیگی، مسرور؛ خزایی، سلمان؛ میرمعینی، عفت السادات؛ مهری، فرشته. بررسی اثربخشی داکسیسیکلین بر بهبود بیومارکرهای استرس اکسیداتیو در بیماران مبتلا به استروک ایسکمیک. مجله پزشکی بالینی ابن سینا، زمستان ۱۴۰۲؛ ۳۰(۴): ۱۹۴-۲۰۱.

مقدمه

می‌شوند. از این تعداد، ۵ میلیون نفر می‌میرند و ۵ میلیون نفر دیگر برای همیشه ناتوان می‌شوند که بار بسیار سنگینی را بر خانواده و جامعه تحمیل می‌کند [۲]. سکتی‌های مغزی بر اساس اتیولوژی به دو نوع سکتی مغزی ایسکمیک و سکتی مغزی هموراژیک تقسیم‌بندی می‌شود که سکتی مغزی ایسکمیک ۸۵ درصد موارد

سکتی مغزی (استروک) یکی از علل شایع نورولوژیک ایجادکننده‌ی ناتوانی و مرگ‌ومیر، به‌خصوص در سنین بالا است که می‌تواند هزینه‌ی درخور توجهی بر فرد و سیستم بهداشت جامعه تحمیل کند [۱]. داده‌های سازمان بهداشت جهانی نشان می‌دهد که سالانه، ۱۵ میلیون نفر در سراسر جهان دچار سکتی مغزی

سکته‌ی مغزی را شامل می‌شود [۳]. مغز به علت فعالیت بالا، بسیار به کاهش جریان خون و در نتیجه، کاهش دریافت اکسیژن و مواد غذایی حساس است؛ بنابراین، هنگام سکته‌ی مغزی ایسکمیک، به علت انسداد نسبی یا کامل عروق مغزی و کاهش خون‌رسانی به مغز، آسیب نسبی یا کامل سلول‌های مغزی در منطقه‌ی درگیر ایسکمی ممکن است اتفاق بیفتد [۴]. بنابراین، مداخلات درمانی سریع و مؤثر در زمان ایسکمی ناشی از سکته‌ی مغزی می‌تواند در جلوگیری از آسیب به سلول‌های مغزی و عوارض حسی و حرکتی ناشی از آن تأثیر داشته باشد. در حال حاضر، تنها درمانی که می‌تواند از عوارض طولانی‌مدت ناشی از سکته‌ی مغزی ایسکمیک جلوگیری کند، داروهای فیبرینولیتیک همچون Tissue Plasminogen Activator (TPA) است. اما استفاده از داروهای فیبرینولیتیک به دلایل مختلف از جمله محدود بودن زمان طلایی برای تزریق آن (در خلال ۴/۵ ساعت بعد از شروع سکته‌ی مغزی)، موارد متعدد کنتراندیکاسیون آن و نیز هزینه‌ی بالای آن نمی‌تواند به عنوان درمانی روتین برای همه‌ی بیماران استفاده شود، لذا معرفی درمان‌های جایگزین مؤثر و ایمن برای این بیماران می‌تواند کمک‌کننده باشد [۵]. شناخت بهتر پاتوفیزیولوژی آسیب مغزی پس از سکته‌ی مغزی می‌تواند در معرفی درمان‌های مؤثر کمک‌کننده باشد. هدف اصلی تحقیقات مربوط به سکته‌ی مغزی توسعه‌ی مداخلات درمانی برای کاهش آسیب مغزی از طریق درک مکانیسم‌های مولکولی بیماری‌زای زیربنایی ایسکمیک است [۴]. شواهد اخیر ارتباط نزدیکی را بین تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و ایجاد مرگ عصبی در اختلالات عصبی مختلف آسیب مغزی حاد مانند ضربه‌ی مغزی و ایسکمی مغزی نشان داده‌اند [۶]. همچنین، گزارش شده است که ارتباط بالقوه‌ای بین استرس اکسیداتیو و ایسکمی مغزی وجود دارد. تولید بیش از حد ROS می‌تواند باعث آسیب عملکردی و ساختاری در سلول‌های عصبی شود و ممکن است نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی ایسکمی مغزی ایفا کند [۷، ۸]. مغز به دلایل مختلفی، مستعد آسیب دیدن رادیکال‌های آزاد است؛ زیرا غنی از اسیدهای چرب غیراشباع است که به‌ویژه در برابر پراکسیداسیون ناشی از رادیکال‌های آزاد، آسیب‌پذیر است. همچنین، دارای محتوای کم آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز، پراکسیداز و گلوکاتایون است [۹، ۱۰]. تتراسایکلین‌ها خانواده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف هستند که امروزه، بسیار در درمان بیماری‌ها استفاده می‌شوند. از زمان کشف آن‌ها، بیش از ۷۰ سال پیش، طیف تتراسایکلین‌های طبیعی و سنتز مشتقات جدید، ترکیبات متعددی را ایجاد کرده است. یکی از مشتقاتی که به‌طور بالینی استفاده می‌شود، داکسی‌سیکلین (DOX; doxycycline) است. داکسی‌سیکلین علاوه بر فعالیت ضدباکتریایی، خواص درمانی نیز دارد. این فعالیت‌ها شامل فعالیت‌های ضدالتهابی، ضدآپوپتوز و آنتی‌اکسیدانی است [۱۱]. به دلیل این اقدامات پلوتروپیک، DOX و سایر مشتقات تتراسایکلین

در درمان طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها استفاده شده‌اند. جالب توجه است که به نظر می‌رسد DOX و سایر مشتقات تتراسایکلین در درمان بیماری‌های مختلف مغزی، ایسکمی و استروک مغزی همراه با التهاب مؤثر هستند. التهاب مزمن معمولاً با استرس اکسیداتیو همراه است. استرس اکسیداتیو زمانی رخ می‌دهد که سطح (ROS) از ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی درون‌زا فراتر رود. مکانیسم استرس اکسیداتیو می‌تواند واکنش‌های التهابی را آغاز کند. به همین ترتیب، واکنش‌های التهابی ممکن است به تولید ROS منجر شود. به همین دلیل، استرس اکسیداتیو می‌تواند چرخه‌ای خودتداوم ایجاد کند و به التهاب مزمن منجر شود. یکی از پیامدهای استرس اکسیداتیو مرتبط با پراکسیداسیون لیپیدی است. پراکسیداسیون لیپیدی به نوبه‌ی خود، می‌تواند واکنشی خودپایه را آغاز کند که به ادامه‌ی پراکسیداسیون لیپیدی و تداوم التهاب منجر می‌شود. محصول جانبی اصلی مالون دی‌آلدئید (MDA) است. با توجه به ارتباط خوب توصیف‌شده بین استرس اکسیداتیو و التهاب مزمن و این واقعیت که DOX در درمان برخی از بیماری‌های التهابی مزمن نشان داده است، این فرضیه وجود دارد که DOX به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند و مستقیماً ROS را از بین می‌برد. علاوه بر این، مشخص شده است که DOX قادر است مستقیماً سوپراکسید را پاک کند و از تشکیل ترکیب‌های افزایشی MDA جلوگیری کند [۱۲]؛ بنابراین، با توجه به مسیرهای پاتوژن احتمالی دخیل در سکته‌ی مغزی ایسکمیک و مکانیسم‌های عملکرد داکسی‌سیکلین، در این مطالعه مقرر شد که به تعیین اثرهای آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی داکسی‌سیکلین در بیماران ناشی از استروک ایسکمیک حاد پرداخته شود.

روش کار

این مطالعه از نوع کارآزمایی بالینی است که در بیمارستان بعث همدان انجام شد. جمعیت مورد مطالعه ۴۸ نفر از بیمارانی بودند که در آن‌ها سکته‌ی مغزی ایسکمیک حاد تشخیص داده شد و در ۲۴ ساعت اول پس از وقوع سکته‌ی مغزی، در بخش مغز و اعصاب بیمارستان بستری شدند. معیارهای ورود به مطالعه شامل سن ۳۰ تا ۷۰ سال، اختلال نورولوژیک کانونی، تشخیص بالینی سکته‌ی حاد ایسکمیک نیم‌کره‌ای، یافته‌های رادیولوژیک تصویربرداری رزونانس مغناطیسی (MRI) و اسکن ریه (CT) منطبق با تشخیص بالینی سکته‌ی حاد نیم‌کره‌ای، عدم بارداری و شیردهی، بیمارانی که در خلال ۲۴ ساعت اول پس از وقوع سکته بستری شده باشند، بیمارانی که برای اولین بار دچار سکته‌ی ایسکمیک مغزی شده‌اند و عدم استفاده از هرگونه ترکیب با اثرهای آنتی‌اکسیدانی در یک ماه گذشته بود. از طرفی، معیارهای خروج از مطالعه شامل خون‌ریزی حاد یا مزمن داخل‌مغزی و آنوریسم مغزی، وجود هر اتیولوژی دیگری به جز ایسکمی، وجود هر نوع اختلال شناختی یا رفتاری که به عدم همکاری بیمار منجر شود، عدم تمایل بیمار به

نانومتر می‌خوانیم. بعد، ورتکس می‌شود و به مدت ۴ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۳۷ درجه می‌گذاریم و سپس، جذب نوری آن را دوباره قرائت می‌کنیم [۱۴].

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های TOS، محتوی گروه تیول و TAC

اندازه‌گیری بر اساس کیت‌های شرکت کیازیت (Cat.No: KTAC96 KTOS96) و بر اساس کاتالوگ کیت انجام گرفت.

اندازه‌گیری مالون دی‌آلدئید (MDA)

برای تعیین محتوای MDA سرم به‌عنوان شاخص اصلی LPO، از ترکیب تیوباربتوریک اسید (TBA) برای ترکیب و واکنش با LPO استفاده می‌شود. نمونه‌ها با کامپوزیت TCA (اسید تری‌کلریک استیک ۲۰ درصد) ترکیب و به‌سرعت، در محلول H₂SO₄ پخش شدند. ترکیب‌های افزایشی TBARS از طریق n- بوتانول به دست آمد و حداکثر جذب به‌صورت کمپلکس صورتی در طول موج ۵۳۲ نانومتر تعیین شد.

در این مطالعه، برای تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نگارش ۲۰ استفاده شد. سطح معنادار آماری کمتر از ۵ درصد در نظر گرفته شد. متغیرهای کمی به‌صورت میانگین و انحراف معیار و متغیرهای کیفی به‌صورت فراوانی و درصد نمایش داده شدند. برای مقایسه‌ی متغیرهای کمی از آزمون تی‌تست یا من‌ویتنی و برای متغیرهای کمی از آزمون مربع کای یا تست دقیق فیشر استفاده شد.

نتایج

در این مطالعه، ۴۸ بیمار مبتلا به استروک که معیارهای ورود به مطالعه را داشتند، به‌طور مساوی و تصادفی، در دو گروه مداخله و کنترل قرار گرفتند. نحوه‌ی انتخاب بیماران در شکل ۱ نمایش داده شده است.

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، هر دو گروه مطالعه از نظر متغیرهای دموگرافیک، بیماری زمینه‌ای و عوامل خطر، اختلاف آماری معنی‌داری نداشتند.

در هر گروه از بیماران، در مقدار میانگین ESR و CRP قبل و پس از شروع درمان، تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد. در هر دو گروه، پس از مداخله، میانگین ESR و CRP کاهش پیدا کرد که این کاهش در گروه مداخله بیشتر بود؛ اما تفاوت دو گروه معنادار نبود (جدول ۲).

در هر دو گروه مطالعه، بیومارکرهای استرس اکسیداتیو قبل از شروع مداخله تفاوت آماری معنی‌داری نداشتند. پس از یک هفته از انجام مداخله، میانگین MDA و TOS در هر دو گروه کاهش پیدا کرد که این کاهش در گروه مداخله بیشتر و معنی‌دار بود. میانگین گلووتاتین و ظرفیت آنتی‌اکسیدان توتال در هر دو گروه افزایش پیدا کرد که این افزایش در گروه مداخله بیشتر و از نظر آماری معنی‌دار بود (جدول ۳).

شرکت در مطالعه، عدم تحمل دارو و بروز عارضه‌ی جانبی، سابقه‌ی حساسیت به داکسی‌سیکلین و فراورده‌های دیگر مشابه آن و بیماران با اختلال بلع دارای (NGT) بود.

در این بررسی، بیماران به‌صورت تصادفی در دو گروه مداخله و کنترل قرار گرفتند. اختصاص بیماران در دو گروه به‌صورت بلوک تصادفی بود. به‌طوری که در یک پاکت ۲ برگه‌ی A و دو برگه‌ی B قرار داشت و هر بار، با برداشتن یکی از برگه‌ها، بیمار در گروه کنترل یا مداخله قرار می‌گرفت. برگه‌های برداشته‌شده تا اتمام برگه‌های داخل پاکت به داخل پاکت برگردانده نشد. تصادفی‌سازی بیماران در گروه‌های مطالعه را پرستاری انجام داد که جزو تیم پژوهش نبود. در گروه مداخله، بیماران در کنار درمان‌های استاندارد، به مدت ۷ روز در هر ۱۲ ساعت، ۱۰۰ میلی‌گرم داکسی‌سیکلین دریافت کردند. انتخاب این دوز درمانی بر اساس مطالعه‌ی Pandya و همکاران بود که به بررسی اثر محافظتی داکسی‌سیکلین بر بافت میوکارد قلب در بیماران با انفارکتوس میوکارد قلبی پرداختند [۱۳]. در گروه کنترل، بیماران در کنار درمان استاندارد، محلول دارونما که متشکل از نشاسته و آویسل در آب بود و ظاهر و رنگی مشابه با محلول دارو داشت، دریافت کردند. به‌منظور بررسی تأثیر داکسی‌سیکلین بر بیومارکرهای استرس اکسیداتیو در بیماران سکته‌ی مغزی ایسکمیک، در یک روز قبل از شروع درمان با داکسی‌سیکلین و ۷ روز پس از درمان، از آزمودن‌های سطح (MDA, TOS, GSH, TAC) استفاده شد. در مرحله‌ی طراحی مطالعه، هر دو گروه از نظر ویژگی‌های دموگرافیک مانند سن، جنس، تحصیلات، مصرف دخانیات و مواد مخدر، محل زندگی، شغل و ابتلا به بیماری‌های زمینه‌ای بررسی شدند و اثر آن‌ها بر سطح شاخص‌های مدنظر بررسی شد. از این بیماران، ۱۰ سی‌سی خون گرفته شد، سرم آن جدا و در فریزر منفی ۸۰ درجه تا روز آنالیز نگهداری شد.

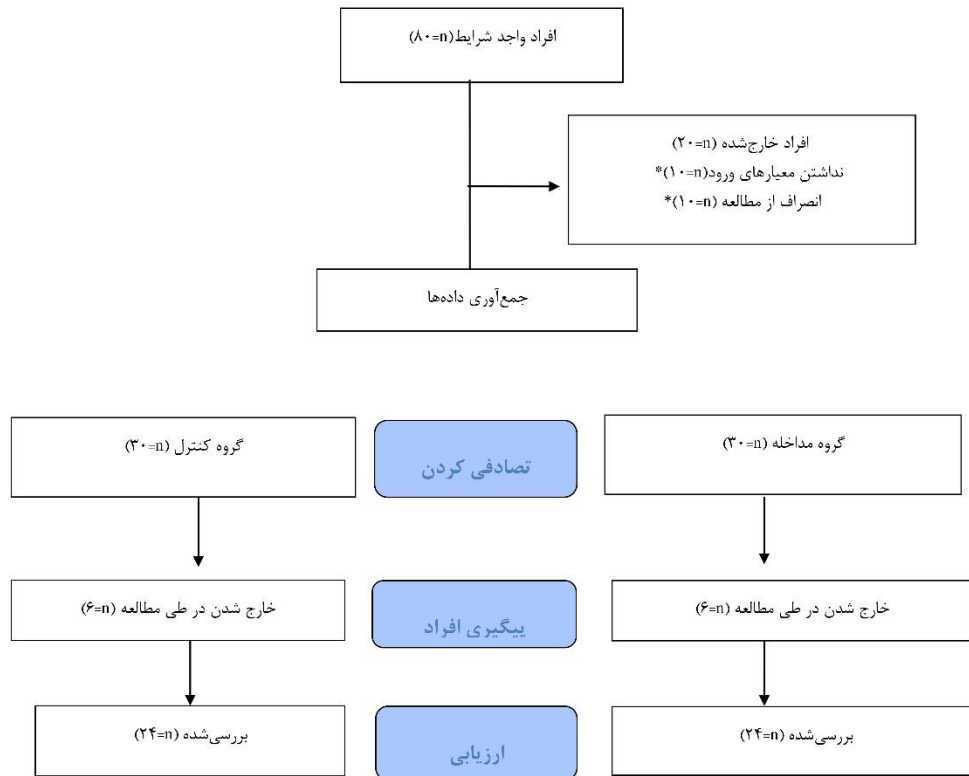
آزمایش‌های بیوشیمیایی مارکرهای التهابی

آزمایش‌های متداول نظیر سنجش مارکرهای التهابی مثل CRP (با به‌کارگیری کیت نیمه‌کمی لاتکس آگلوتیناسیون بیونیک) و ESR (با استفاده از دستگاه اتوماتیک ESR Reader, Sedimex) انجام شد.

سنجش بیومارکرهای استرس اکسیداتیو

اندازه‌گیری TAC به روش FRAP

به‌منظور سنجش TAC از روش FRAP استفاده شد. در این روش، کمپلکس ferric tripyridyl triazine (Fe III TPTZ) در PH پایین به فرم فروس Fe II (که رنگ مایل به آبی دارد) تبدیل می‌شود. با اندازه‌گیری تغییرات جذب در طول موج ۵۹۳ نانومتر، این تغییر قابل اندازه‌گیری است. این واکنش غیراختصاصی است و تغییرات جذب با ترکیب یا قدرت احیاکنندگی کلی الکترون‌دهندگی آنتی‌اکسیدان موجود در ترکیب واکنش ارتباط مستقیمی دارد. در این روش، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه را به ۳ میلی‌لیتر معرف FRAP اضافه می‌کنیم. سپس، در طول موج ۵۹۳



شکل ۱: فلوچارت انتخاب بیماران در گروه کنترل و مداخله

جدول ۱: مقایسه‌ی مشخصات دموگرافیک و عوامل خطر در دو گروه مطالعه

متغیر	گروه کنترل n=۲۴	گروه مداخله n=۲۴	P
جنسیت، تعداد (درصد)	زن ۱۲ (۵۰/۰)	زن ۱۳ (۵۴/۲)	*۱/۰۰
	مرد ۱۲ (۵۰/۰)	مرد ۱۱ (۴۵/۸)	
مصرف سیگار، تعداد (درصد)	بلی ۱۴ (۵۸/۳)	بلی ۹ (۳۷/۵)	*۰/۲۴۸
	خیر ۱۰ (۴۱/۷)	خیر ۱۵ (۶۲/۵)	
بیماری ایسکمیک قلبی، تعداد (درصد)	بلی ۱۰ (۴۱/۷)	بلی ۷ (۲۹/۲)	*۰/۵۴۷
	خیر ۱۴ (۵۸/۳)	خیر ۱۷ (۷۰/۸)	
فشارخون، تعداد (درصد)	بلی ۱۶ (۶۶/۷)	بلی ۱۰ (۴۱/۷)	*۰/۱۴۷
	خیر ۸ (۳۳/۳)	خیر ۱۴ (۵۸/۳)	
دیس‌لیپیدمی، تعداد (درصد)	بلی ۱۴ (۵۸/۳)	بلی ۱۲ (۵۰/۰)	*۰/۷۷۲
	خیر ۱۰ (۴۱/۷)	خیر ۱۲ (۵۰/۰)	
سن (سال)، انحراف معیار ± میانگین	۶۸/۱ ± ۱۴/۹	۶۸/۷ ± ۱۰/۹	**۰/۸۷۱

: Fisher's exact, **: t-test*

جدول ۲: مقایسه‌ی فاکتور التهابی قبل و پس از مداخله در هر دو گروه درمانی

متغیر		گروه کنترل	گروه مداخله	*P
		انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین	
ESR	قبل از مداخله	۱۰/۹ ± ۹/۸	۱۱/۹ ± ۱۱/۹	۰/۴۵۳
	پس از مداخله	۷/۹ ± ۶/۵	۶/۱ ± ۳/۰	۰/۶۱۰
CRP	قبل از مداخله	۵/۰ ± ۲/۹	۴/۶ ± ۲/۵	۰/۹۲۵
	پس از مداخله	۳/۹ ± ۲/۸	۳/۵ ± ۳/۱	۰/۱۴۴

* (Mann-Whitney)

جدول ۳: مقایسه‌ی بیومارکرهای استرس اکسیداتیو قبل و پس از مداخله در هر دو گروه درمانی

متغیر	گروه کنترل		*P
	انحراف معیار $\pm$ میانگین	انحراف معیار $\pm$ میانگین	
MDA	قبل از مداخله	۱۲۳/۹ $\pm$ ۶۱/۹	۰/۳۳۲
	پس از مداخله	۱۰۸/۰ $\pm$ ۷۳/۸	۰/۰۰۱
TOS	قبل از مداخله	۲۷/۵ $\pm$ ۱۲/۹	۰/۶۹۹
	پس از مداخله	۲۵/۵ $\pm$ ۸/۴	۰/۰۱۳
TAC	قبل از مداخله	۴/۰ $\pm$ ۱/۱	۰/۰۸۵
	پس از مداخله	۴/۲ $\pm$ ۲/۴	۰/۰۲۵
GSH	قبل از مداخله	۱۹۱/۳ $\pm$ ۴۷/۹	۰/۵۲۲
	پس از مداخله	۲۰۴/۵ $\pm$ ۸۶/۷	۰/۰۴۸

* (Mann-Whitney)

بحث

سکته‌ی مغزی علاوه بر اینکه دومین علت مرگ‌ومیر است، علت اصلی ناتوانی در بسیاری از بزرگسالان است؛ بنابراین، سکته‌ی مغزی بار اجتماعی و اقتصادی بسیار زیادی دارد، به‌طوری که یک‌سوم بیماران سکته‌ی مغزی به حمایتگر دائمی برای تمام عمر نیاز دارند. هدف از انجام مطالعه‌ی کارآزمایی بالینی حاضر تعیین اثربخشی داکسی‌سیکلین بر بهبود بیومارکرهای استرس اکسیداتیو در بیماران مبتلا به استروک ایسکمیک بود. یافته‌های مطالعه نشان داد که مصرف داکسی‌سیکلین به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم روزانه، به مدت یک هفته، علاوه بر درمان استاندارد، می‌تواند باعث کاهش بیومارکرهای استرس اکسیداتیو و افزایش بیومارکرهای آنتی‌اکسیدانی در بیماران مبتلا به استروک ایسکمیک در ۲۴ ساعت اول پس از استروک آن‌ها شود.

در دهه‌های اخیر، شاهد دستاوردهای فوق‌العاده‌ای در توانایی تشخیص استروک بوده‌ایم؛ اما درمان این بیماران هنوز رضایت‌بخش نیست. به‌گونه‌ای که سکته‌ی مغزی همچنان یکی از علل مهم عوارض نورولوژیک و ناتوانی طولانی‌مدت است. یافته‌های قبلی نشان می‌دهند که تقریباً ۴۰ درصد از بازماندگان برای مراقبت از خود استقلال کافی را ندارند و ۲۵ درصد قادر به راه رفتن مستقل نیستند [۱۵]. تنها مداخله‌ی دارویی تأییدشده برای سکته‌ی مغزی تجویز داخل‌وریدی فعال‌کننده‌ی پلاسمینوژن بافتی ترومبولیتیک نوترکیب (tPA) در عرض ۴ تا ۵ ساعت از شروع ایسکمیک است. [۱۶]. بنابراین، یافتن درمان دارویی جدید برای سکته‌ی مغزی به‌دلایل متعددی، پیچیده است؛ زیرا مغز عضو بسیار فعال متابولیکی است که به ۲۰ درصد اکسیژن و ۲ درصد از کل گلوکز ثابت از گردش خون متکی است. ذخیره‌ی انرژی و متابولیسم در مغز بسیار کم است و به همین دلیل، مغز به‌طور استثنایی، بدون وقفه، نیازمند خون‌رسانی است [۱۷]. قطع گذرا یا دائمی جریان شریان مغزی به سکته‌ی مغزی ایسکمیک منجر می‌شود که به آسیب دیدن یا اختلال بازگشت‌ناپذیر سلول‌های بافت آسیب‌دیده در بیماران منتهی می‌شود. سد خونی مغزی (BBB) تحت شرایط فیزیولوژیکی نرمال، از مغز در برابر سموم سیستمیک محافظت

می‌کند؛ اما در طول ایسکمیک، این سد شکسته می‌شود و اجازه‌ی نفوذ را به واسطه‌های التهابی و سایر مولکول‌های بالقوه سمی می‌دهد [۱۸]. درمان آنتی‌اکسیدانی به‌عنوان نوعی استراتژی برای کاهش میزان آسیب ناشی از سکته‌ی مغزی ایسکمیک با درجات مختلف در سال‌های اخیر بررسی شده است. این استراتژی‌ها به‌طور گسترده، تلاش می‌کنند تولید ROS را مهار کند. نشان داده‌اند که ترکیبات با خواص آنتی‌اکسیدانی قابل توجه، از جمله آلبومین سرم انسانی، ویتامین C و اسید اوریک، آسیب مغزی ناشی از سکته‌ی مغزی را در مدل‌های حیوانی کاهش می‌دهند [۱۹، ۲۰]. اما در ارتباط با آنتی‌بیوتیک ضدالتهابی، مطالعات کافی در دسترس نیست. در ارتباط با تأثیر داکسی‌سیکلین در بیماران استروک، مطالعات با مدل حیوانی زیادی انجام شده است و مطالعات کارآزمایی بالینی انسانی در این زمینه محدود است. یافته‌های مطالعه‌ی Ozkul و همکاران در سال ۲۰۰۷ درباره‌ی ۷۰ بیمار مبتلا به استروک ایسکمیک نشان داد که ماینوسایکلین از طریق اثر مهار بر مسیرهای استرس اکسیداتیو، باعث کاهش آسیب واردشده به مغز و در نتیجه، بهبود پیامدهای استروک می‌شود [۲۱].

یافته‌های مطالعه‌ی حیوانی Clark و همکاران [۲۲] در سال ۱۹۹۷، نشان داد که تزریق داکسی‌سیکلین قبل و بعد از ایسکمیک مغزی، دارای اثر محافظتی بر سلول‌های مغز است و از آسیب مغزی ناشی از ایسکمیک جلوگیری می‌کند. نتایج مطالعه‌ی Reasoner و همکاران [۲۳] درباره‌ی خرگوش نشان داد که داکسی‌سیکلین از طریق اثر مهار بر عملکرد لکوسیت‌ها و کاهش پاسخ‌های التهابی، باعث کاهش آسیب واردشده به مغز و در نتیجه، کاهش اختلالات نورولوژیک ناشی از آن می‌شود. نتیجه‌ی مطالعه‌ی حاضر همسو با مطالعات پیشین بود، به‌طوری که سطح سرمی ESR و CRP در بیمارانی که داکسی‌سیکلین دریافت کردند، نسبت به گروه کنترل کمتر بود، هرچند از نظر آماری، معنی‌دار نبود. نتایج مطالعه‌ی حیوانی Fan و همکاران در سال ۲۰۱۳ با مدل حیوانی استروک ایسکمیک نشان داد که استفاده از ماینوسایکلین در ترکیب با آلتپلاز باعث کاهش میزان التهاب، تورم بافت مغز، آسیب مغزی و

ریسک خونریزی بعد از استروک ایسکمیک می‌شود [۲۴]. نتایج مطالعه‌ی تجربی Jiang و همکاران در سال ۲۰۱۲ با مدل حیوانی نشان داد که تتراسایکلین از طریق کاهش سطح فاکتورهای التهابی، می‌تواند از فعال شدن بیش از حد فاگوسیت‌ها و در نتیجه، با مهار اتوفازی، از آسیب مغزی ناشی از استروک ایسکمیک جلوگیری کند [۲۵]. نتایج این مطالعات هرچند با طراحی‌ها و جمعیت‌های متفاوت گزارش شده، همسو با یافته‌های مطالعه حاضر است.

در سایر مطالعات انجام‌شده نیز نشان داده‌اند که داکسیسیکلین باعث کاهش استرس اکسیداتیو می‌شود؛ از جمله در مطالعه‌ی Saeed و همکاران در سال ۲۰۱۹، مشاهده شد که مصرف دوزهای پایین داکسیسیکلین در بیماران نیازمند CABG می‌تواند از استرس اکسیداتیو جلوگیری کند [۲۶]. سایر مطالعات نیز نشان داده‌اند که داکسیسیکلین با دوز پایین دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و حذف‌کننده‌ی ROS است. در میان مشتقات تتراسایکلین، داکسیسیکلین قوی‌ترین مهارکننده‌ی MMP حتی در دوزهای پایین است. داکسیسیکلین علاوه بر در دسترس بودن، جذب سریع و کامل پس از مصرف خوراکی، عوارض جانبی قابل تحملی دارد و ارزان است. به همین دلیل، در کاهش سیتوکین‌های پیش‌التهابی مؤثرتر از تتراسایکلین است [۲۷]. بنابراین، چنانچه نتایج مطالعات کارآزمایی بالینی با حجم نمونه‌ی بیشتر و اثربخشی آن در بیماران مبتلا به استروک تأیید شود، می‌تواند گزینه‌ی درمانی مناسبی علاوه بر درمان‌های در دسترس برای این بیماران باشد. توجه منطقی دیگر برای پیشنهاد استفاده از داکسیسیکلین در بیماران استروک این است که بسیاری از بیماران مبتلا به استروک، صرف‌نظر از درمانی که می‌گیرند، به بیماری‌های عفونی پس از استروک مبتلا می‌شوند. در واقع، عفونت یکی از عوارض شایع بیماران مبتلا به استروک حاد است. این بیماران به دلیل هوشیاری ضعیف، آسپیراسیون، دیس‌فاژی و بیماری‌های زمینه‌ای که دارند، مستعد بیماری‌های عفونی هستند [۲۸]. میزان بروز عفونت پس از استروک از ۵ درصد تا ۶۵ درصد متغیر است. داکسیسایکلین نوعی آنتی‌بیوتیک مصنوعی مشتق از تتراسایکلین با طیف وسیع باکتریواستاتیک است. این داروی طولانی‌اثر در اکثر بافت‌های بدن می‌تواند نفوذ کند؛ بنابراین، علیه بسیاری از باکترهای گرم مثبت و منفی، مانند هموفیلوس آنفلوانزا، مؤثر است. این دارو همچنین، داروی انتخابی در عفونت ناشی از پنومونی در اثر مایکوپلاسما است. علاوه بر تأثیر در بیماران مبتلا به پنومونی، دارای اثر ضدویروسی، تعدیل‌کننده‌ی سیستم ایمنی و محافظت‌کننده‌ی قلب (cardioprotective) است [۲۹]. همچنین، پنومونی از عفونت‌های شایع پس از استروک حاد است که بر اساس مطالعات انجام‌شده، خطر مرگ‌ومیر را در بیماران استروک تا سه برابر افزایش

می‌دهد. یکی دیگر از بیماری‌های شایع عفونی پس از استروک، به‌ویژه در زنان، عفونت دستگاه ادراری است [۳۰]؛ بنابراین، علاوه بر تأثیر آن بر بیومارکرهای استرس اکسیداتیو، اثر آنتی‌بیوتیکی آن می‌تواند در این بیماران مفید باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که داکسیسیکلین استرس اکسیداتیو را در بیماران استروک ایسکمیک به‌وسیله‌ی مهار گونه‌های فعال اکسیژن کاهش می‌دهد و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های سرم را به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی بهبود می‌بخشد. این داده‌ها ممکن است به مدیریت و استراتژی‌های درمانی بیماران استروک ایسکمیک کمک کند. با این حال، ارزیابی‌های بیشتری برای نشان دادن مکانیسم مولکولی اثرهای داکسیسیکلین بر استرس اکسیداتیو در مطالعات با حجم نمونه‌ی بزرگ‌تر لازم است.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکتری حرفه‌ای پزشکی، مصوب دانشگاه علوم پزشکی همدان به شماره‌ی ۱۴۰۱۱۱۱۹۸۰۶ است. بدین‌وسیله، از کارکنان محترم بخش نورولوژی بیمارستان بعثت و بیماران ارجمند قدردانی می‌شود.

تضاد منافع

نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان در تعارض نیست.

ملاحظات اخلاقی

کمیت‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی همدان با شناسه‌ی IR.UMSHA.REC.1401.840 انجام مطالعه را تأیید کرده است. همچنین، این مطالعه در مرکز کارآزمایی‌های بالینی ایران با شناسه‌ی IRCT20170114031921N6 ثبت شد. در ضمن، از تمام بیماران رضایت‌نامه‌ی آگاهانه‌ی کتبی دریافت شد.

سهم نویسندگان

نویسنده‌ی اول (پژوهشگر اصلی): مشارکت در ایده‌پردازی و طراحی پروژه، معاینات بالینی، مشارکت در تدوین بخش‌های مختلف طرح، ویرایش علمی مقاله (۳۰ درصد)؛ نویسنده‌ی دوم (پژوهشگر اصلی): تدوین پروپوزال، جمع‌آوری داده‌ها، تدوین بخش‌های مختلف طرح، نگارش مقاله (۲۰ درصد)؛ نویسنده‌ی سوم (پژوهشگر همکار): مشاور آماری، تدوین بخش روش‌شناسی طرح (۱۰ درصد)؛ نویسنده‌ی چهارم (پژوهشگر همکار): بازنگری متون، مشارکت در جمع‌آوری داده‌ها و نگارش مقاله (۱۰ درصد)؛ نویسنده‌ی پنجم (پژوهشگر اصلی): مسئول مکاتبات، ایده‌پردازی و طراحی پروژه، مشارکت در تدوین بخش‌های مختلف طرح، تفسیر نتایج، ویرایش علمی مقاله (۳۰ درصد).

حمایت مالی

دانشگاه علوم پزشکی همدان از این طرح حمایت مالی کرده است.

REFERENCES

- González RG, Hirsch JA, Koroshetz W, Lev MH, Schaefer PW. Acute ischemic stroke. Springer. 2011.
- Thrift AG, Thayabaranathan T, Howard G, Howard VJ,

Rothwell PM, Feigin VL, et al. Global stroke statistics. *Int J Stroke*. 2017;12(1):13-32. PMID: 27794138 DOI: 10.1177/1747493016676285

3. Mathers CD, Boerma T, Ma Fat D. Global and regional causes of death. *Br Med Bull*. 2009;**92**:7-32. [PMID: 19776034](#) [DOI: 10.1093/bmb/ldp028](#)
4. Johnson W, Onuma O, Owolabi M, Sachdev S. Stroke: a global response is needed. *Bull World Health Organ*. 2016;**94**(9):634-634A. [PMID: 27708464](#) [DOI: 10.2471/BLT.16.181636](#)
5. Kwiatkowski TG, Libman RB, Frankel M, Tilley BC, Morgenstern LB, Lu M, et al. Effects of tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke at one year. *N Engl J Med*. 1999;**340**(23):1781-7. [PMID: 10362821](#) [DOI: 10.1056/NEJM199906103402302](#)
6. Lv W, Xu J, Wang X, Li X, Xu Q, Xin H. Bioengineered boronic ester modified dextran polymer nanoparticles as reactive oxygen species responsive nanocarrier for ischemic stroke treatment. *ACS Nano*. 2018;**12**(6):5417-26. [PMID: 29869497](#) [DOI: 10.1021/acsnano.8b00477](#)
7. Crack PJ, Taylor JM. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radic Biol Med*. 2005;**38**(11):1433-44. [PMID: 15890617](#) [DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.01.019](#)
8. Orellana-Urzuá S, Rojas I, Libano L, Rodrigo R. Pathophysiology of Ischemic Stroke: Role of Oxidative Stress. *Curr Pharm Des*. 2020;**26**(34):4246-60. [PMID: 32640953](#) [DOI: 10.2174/1381612826666200708133912](#)
9. Bolaños JP, Moro MA, Lizasoain I, Almeida A. Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: Therapeutic implications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;**61**(14):1299-315. [PMID: 19716390](#) [DOI: 10.1016/j.addr.2009.05.009](#)
10. Kim S, Lee W, Jo H, Sonn SK, Jeong SJ, Seo S, et al. The antioxidant enzyme Peroxiredoxin-1 controls stroke-associated microglia against acute ischemic stroke. *Redox Biol*. 2022;**54**:102347. [PMID: 35688114](#) [DOI: 10.1016/j.redox.2022.102347](#)
11. Franco C, Ho B, Mulholland D, Hou G, Islam M, Donaldson K, et al. Doxycycline alters vascular smooth muscle cell adhesion, migration, and reorganization of fibrillar collagen matrices. *Am J Pathol*. 2006;**168**(5):1697-709. [PMID: 16651635](#) [DOI: 10.2353/ajpath.2006.050613](#)
12. Clemens DL, Duryee MJ, Sarmiento C, Chiou A, McGowan JD, Hunter CD, et al. Novel antioxidant properties of doxycycline. *Int J Mol Sci*. 2018;**19**(12):4078. [PMID: 30562944](#) [DOI: 10.3390/ijms19124078](#)
13. Pandya R, Mao L, Zhou H, Zhou S, Zeng J, John Popp A, et al. Central nervous system agents for ischemic stroke: neuroprotection mechanisms. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 2011;**11**(2):81-97. [PMID: 21521165](#) [DOI: 10.2174/187152411796011321](#)
14. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996;**239**(1):70-6. [PMID: 8660627](#) [DOI: 10.1006/abio.1996.0292](#)
15. Lyden P, Zivin J. Hemorrhagic transformation after cerebral ischemia: mechanisms and incidence. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1993;**5**(1):1-16. [PMID: 8452759](#)
16. Adeoye O, Hornung R, Khatri P, Kleindorfer D. Recombinant tissue-type plasminogen activator use for ischemic stroke in the United States: a doubling of treatment rates over the course of 5 years. *Stroke*. 2011;**42**(7):1952-5. [PMID: 21636813](#) [DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.612358](#)
17. Herculano-Houzel S. Scaling of brain metabolism with a fixed energy budget per neuron: implications for neuronal activity, plasticity and evolution. *PLoS One*. 2011;**6**(3):e17514. [PMID: 21390261](#) [DOI: 10.1371/journal.pone.0017514](#)
18. Shirley R, Ord EN, Work LM. Oxidative stress and the use of antioxidants in stroke. *Antioxidants (Basel)*. 2014;**3**(3):472-501. [PMID: 26785066](#) [DOI: 10.3390/antiox3030472](#)
19. Lapchak PA, Zivin JA. Ebselen, a seleno-organic antioxidant, is neuroprotective after embolic strokes in rabbits: synergism with low-dose tissue plasminogen activator. *Stroke*. 2003;**34**(8):2013-8. [PMID: 12855833](#) [DOI: 10.1161/01.STR.0000081223.74129.04](#)
20. Yu ZF, Bruce-Keller AJ, Goodman Y, Mattson MP. Uric acid protects neurons against excitotoxic and metabolic insults in cell culture, and against focal ischemic brain injury in vivo. *J Neurosci Res*. 1998;**53**(5):613-25. [PMID: 9726432](#) [DOI: 10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19980901\)53:5<613::AID-JNR11>3.0.CO;2-1](#)
21. Ozkul A, Akyol A, Yenisey C, Arpacı E, Kiyilgolu N, Tataroglu C. Oxidative stress in acute ischemic stroke. *J Clin Neurosci*. 2007;**14**(11):1062-6. [PMID: 17884504](#) [DOI: 10.1016/j.jocn.2006.11.008](#)
22. Clark WM, Lessov N, Lauten JD, Hazel K. Doxycycline treatment reduces ischemic brain damage in transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Mol Neurosci*. 1997;**9**(2):103-8. [PMID: 9407391](#) [DOI: 10.1007/BF02736854](#)
23. Reasoner DK, Hindman BJ, Dexter F, Subieta A, Outkomp J, Smith T. Doxycycline reduces early neurologic impairment after cerebral arterial air embolism in the rabbit. *Anesthesiology*. 1997;**87**(3):569-76. [PMID: 9316962](#) [DOI: 10.1097/00000542-199709000-00017](#)
24. Fan X, Lo EH, Wang X. Effects of minocycline plus tissue plasminogen activator combination therapy after focal embolic stroke in type 1 diabetic rats. *Stroke*. 2013;**44**(3):745-52. [PMID: 23422086](#) [DOI: 10.1161/STROKEAHA.111.000309](#)
25. Jiang Y, Zhu J, Wu L, Xu G, Dai J, Liu X. Tetracycline inhibits local inflammation induced by cerebral ischemia via modulating autophagy. *PLoS One*. 2012;**7**(11):e48672. [PMID: 23144925](#) [DOI: 10.1371/journal.pone.0048672](#)
26. Saeed M, Arun MZ, Guzeloglu M, Onursal C, Gokce G, Korkmaz CG, et al. Low-dose doxycycline inhibits hydrogen peroxide-induced oxidative stress, MMP-2 up-regulation and contractile dysfunction in human saphenous vein grafts. *Drug Des Devel Ther*. 2019;**13**:1791-801. [PMID: 31213768](#) [DOI: 10.2147/DDDT.S187842](#)
27. Castro JE, Vado-Solis I, Perez-Osorio C, Fredeking TM. Modulation of cytokine and cytokine receptor/antagonist by treatment with doxycycline and tetracycline in patients with dengue fever. *Clin Dev Immunol*. 2011;**2011**:370872. [PMID: 21461372](#) [DOI: 10.1155/2011/370872](#)
28. Hannawi Y, Hannawi B, Rao CP, Suarez JI, Bershad EM. Stroke-associated pneumonia: major advances and obstacles. *Cerebrovasc Dis*. 2013;**35**(5):430-43. [PMID: 23735757](#) [DOI: 10.1159/000350199](#)
29. Cerisano G, Buonamici P, Valenti R, Sciagrà R, Raspanti S, Santini A, et al. Early short-term doxycycline therapy in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction to prevent the ominous progression to adverse remodelling: the TIPTOP trial. *Eur Heart J*. 2014;**35**(3):184-91. [PMID: 24104875](#) [DOI: 10.1093/eurheartj/eh420](#)
30. Nederkoorn PJ, Westendorp WF, Hooijenga IJ, de Haan RJ, Dippel DW, Vermeij FH, et al. Preventive antibiotics in stroke study: rationale and protocol for a randomised trial. *Int J Stroke*. 2011;**6**(2):159-63. [PMID: 21371281](#) [DOI: 10.1111/j.1747-4949.2010.00555.x](#)