

بررسی اثر پیش شرطی سازی با هیپرکسی نورموباریک متناوب و پیوسته بر میزان بیان ژن آنزیم تبدیل کننده $TNF-\alpha$ (TACE) و سطح $TNF-\alpha$ سرم در موش بزرگ آزمایشگاهی نر

محمد رضا بیگدلی ^{۱*} Ph.D.، سهراب حاجی زاده ^{۲*} Ph.D.، مهدی رهنما ^{۳***} Ph.D.،
علی خوش باطن ^{۴***} Ph.D.، علی حیدریان پور ^{۵***} Ph.D.

چکیده

هدف: پیش شرطی سازی به ایسکمی یکی از پدیده‌های درون‌زاد است که می‌تواند توسط عوامل مختلف و از مسیرهای مولکولی متفاوت، تحمل به ایسکمی (IT) را در بافت‌های مختلف مانند مغز ایجاد کند. در این مطالعه اثر پیش شرطی سازی به واسطه هیپرکسی نورموباریک (NBHO) پیوسته و متناوب بر سطح $TNF-\alpha$ و میزان بیان آنزیم تبدیل کننده $TNF-\alpha$ مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی: رت‌ها در چهار گروه به صورت گروه‌های پیوسته (۲۴ ساعت پیوسته) و متناوب (۴ ساعت در روز به مدت ۶ روز) در معرض NBHO و نورموکسی نورموباریک (NBNO) قرار می‌گرفتند. هر گروه به سه زیر گروه تقسیم می‌شدند. زیر گروه اول، بعد از ۲۴ ساعت، تحت جراحی انسداد شریان میانی مغز (MCAO) به مدت ۶۰ دقیقه قرار می‌گرفتند و سپس ۲۴ ساعت به آنها اجازه برقراری مجدد جریان خون داده می‌شد. زیر گروه دوم و سوم بنام زیر گروه شم (بدون MCAO) و گروه دست نخورده (بدون جراحی) برای بررسی اثر هیپرکسی نورموباریک بر بیان آنزیم تبدیل کننده $TNF-\alpha$ و سطح $TNF-\alpha$ سرم در نظر گرفته شده بودند.

یافته‌ها: یافته‌های ما نشان می‌دهد که NBHO متناوب و پیوسته در القای IT درگیر هستند. آثار IT بر بیان آنزیم تبدیل کننده $TNF-\alpha$ و سطح $TNF-\alpha$ سرم در روشهای پیوسته و متناوب یکسان نبودند و NBHO پیوسته نسبت به متناوب اثر قوی‌تری داشت. پیش درمان با NBHO پیوسته و متناوب بیان آنزیم تبدیل کننده $TNF-\alpha$ و سطح $TNF-\alpha$ سرم را به طور معنی‌دار افزایش می‌دهد. اثر توأم هیپرکسی نورموباریک متناوب و ایسکمی بر بیان آنزیم تبدیل کننده $TNF-\alpha$ و سطح $TNF-\alpha$ سرم نیز به طور معنی‌داری بیشتر از اثر تنهای هیپرکسی نورموباریک متناوب است.

نتیجه‌گیری: اگرچه برای شناخت مکانیسم حفاظت عصبی حاصل از هیپرکسی نورموباریک مطالعات زیادی لازم است، اما نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که هیپرکسی نورموباریک آثار حفاظت عصبی خود را احتمالاً تاحدی از طریق افزایش سطح $TNF-\alpha$ و میزان بیان آنزیم تبدیل کننده $TNF-\alpha$ نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: پیش شرطی سازی به ایسکمی، آنزیم تبدیل کننده $TNF-\alpha$ ، سکتة مغزی، $TNF-\alpha$ ، هیپرکسی نورموباریک

دریافت مقاله: ۸۶/۴/۲۱، اصلاح مقاله: ۸۶/۱۲/۱۸، پذیرش مقاله: ۸۶/۱۲/۲۳

کوش نویسندة مسئول: استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی زنجان، زنجان - ایران

* استاد گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

** گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی زنجان

*** استاد گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیة‌الله (عج) و مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی

**** گروه فیزیولوژی ورزش، دانشگاه بوعلی‌سینا همدان

آدرس پست الکترونیکی: bigdelimohammadreza@yahoo.com

مقدمه

برای ایجاد این مرحله به سنتز پروتئین جدید نیاز است و به مدت چند روز یا هفته می‌تواند ادامه داشته باشد (۱۵،۱۶). البته روابط علی و معلولی بین دو مرحله از لحاظ مکانیسمی ناشناخته باقی مانده است. پیش‌شرطی سازی به ایسکمی ممکن است اجزای عصبی، میوکاری، عروقی را درگیر سازد که فرایندهای متعدد سلولی را جامعیت می‌دهد تا در نهایت منجر به کاهش هزینه انرژی و آسیب خون‌رسانی مجدد شود.

فاکتور تومور نکروز-آلفا (TNF- α) در مکانیسم‌های حفاظت مغزی در برابر آسیب‌های حاصل از ایسکمی اخیراً به مقدار زیادی مورد تاکید قرار گرفته است (۱۷-۱۲). با در نظر گرفتن نقش حفاظت مغزی TNF- α ، برخی مطالعات نشان داده‌اند که TNF- α به عنوان یک میانجی کلیدی در IPC عمل می‌کند (۲۱،۲۲).

TNF- α به واسطه پروتئاز متصل به غشا به حالت محلول رها می‌شود. این آنزیم به عنوان پروتئین غیرجامعیت دهنده (دیس اینتگرین) و متالوپروتئیناز (ADAM)^۸ موسوم به آنزیم تبدیل کننده^۹ TNF- α (TACE/ADAM) عمل می‌کند (۲۳). همچنین، محققین اخیراً نشان داده‌اند که بعد از پیش‌شرطی سازی به ایسکمی به واسطه برخی عوامل مانند القای محرومیت اکسیژن و گلوکز در شرایط *in vitro* آنزیم TACE دچار تنظیم افزایشی می‌شود و نقش حیاتی در حفاظت مغزی^{۱۰} ایفا می‌کند (۲۴). نتایج نشان می‌دهد که افزایش القای محرومیت اکسیژن و گلوکز^{۱۱} (OGD)، گلوتامات خارج سلولی را در محیط‌های کشت که در معرض پیش‌شرطی سازی به ایسکمی قرار می‌گیرند پایین می‌آورد. این اثر توسط BB3103 (مهارکننده TACE) و آنتی TNF- α بلوک می‌شود و با انکوباسیون قبلی با TNF- α تقلید می‌گردد (۳۶۱). بنابراین درگیری آنزیم TACE و TNF- α در پیش‌شرطی سازی حاصل از محرومیت اکسیژن و گلوکز در شرایط *in vitro* به اثبات رسیده است (۲۴،۲۱،۱). اما اثر هیپرکسی بر میزان بیان ژن آنزیم تبدیل کننده TNF- α و سطح سرم TNF- α در شرایط

تحریکات آسیب‌رسان در دوزهای پایین و کم، البته زیر آستانه آسیب‌رسان به سلول، پاسخ سازشی القا می‌کند که مغز را در برابر استرس‌های دیگر حاصل از همین تحریکات آسیب‌رسان (تحمل^۱) یا دیگر تحریکات آسیب‌رسان (تحمل متقابل^۲) حفاظت می‌کند (۱). در بین استرس‌های مختلف، هیپوکسی (۲)، ایسکمی (۳)، تشنج (۴)، آنوکسی (۵)، افسردگی منتشر^۳ (۶)، گرما (۷)، استرس اکسیداتیو (۸)، تیمار با اسیدهای چرب اشباع نشده [۹]، و مهار کننده‌های فسفوریلاسیون اکسیداتیو (۱۰) فرایند تحمل مغز در برابر ایسکمی^۴ (کامل یا کانونی) را القا می‌کنند. چندین گزارش وجود دارد که هیپرکسی نیز باعث بروز تحمل به ایسکمی می‌شود (۱۱، ۱۲).

پیش‌شرطی سازی^۵ برای ایجاد تحمل به ایسکمی پدیده‌ای است که در آن دوره‌های کوتاه آسیب خفیف زیر کشنده، حفاظت قدرتمندی در برابر آثار زیان‌آور ایسکمی کشنده، طولانی و متوالی القا می‌کند (۱۳). تحریکات زیرکشنده که شالوده واقعه پیش‌شرطی سازی را می‌سازد، کاملاً متنوع است که در بالا ذکر شد. بدین ترتیب، محدوده تحمل به ایسکمی وسیع است. آثار مفید پیش‌شرطی سازی اولین بار در قلب نشان داده شد. اکنون روشن شده است که پیش‌شرطی سازی می‌تواند تحمل به ایسکمی را در اندام‌ها و دستگاه‌های مختلف از جمله مغز، قلب، کبد، روده کوچک، عضله اسکلتی، و ریه‌ها القا کند (۱۴). دو مرحله متمایز حفاظت حاصل از تحریکات پیش‌شرطی سازی از لحاظ زمانی و مکانیسمی وجود دارد. این دو مرحله تحت عنوان پیش‌شرطی سازی حاد و تأخیری نامگذاری شده‌اند. مرحله حاد با تغییرات بعد از ترجمه‌ای^۶ پروتئین‌ها مرتبط است و ظرف چند دقیقه مشاهده می‌شود و بعد از دو تا سه ساعت از بین می‌رود. مرحله دوم یا تأخیری چند ساعت بعد از وقوع پیش‌شرطی سازی پدید می‌آید، و

1- Tolerance

2- Cross tolerance

3- Spreading depression

4- Ischemic tolerance

5- Preconditioning

6- Posttranslational

7- Ischemic preconditioning

8- a disintegrin and metalloproteinase

9- TNF- α converting enzyme

10- Neuroprotection

11- Oxygen glucose deprivation

in vivo و in vitro هنوز ناشناخته است.

اهداف اصلی در این مطالعه عبارتند از:

۱. بررسی اثر حفاظت عصبی حاصل از هیپرکسی نورموباریک متناوب و پیوسته بر نقص‌های نورولوژیک حاصل از سکته مغزی.
۲. بررسی اثر حفاظت عصبی حاصل از هیپرکسی نورموباریک متناوب و پیوسته بر سطح سرم TNF- α .
۳. بررسی اثر حفاظت عصبی حاصل از هیپرکسی نورموباریک متناوب و پیوسته بر میزان بیان ژن آنزیم تبدیل کننده TNF- α (TACE).

۴. بررسی آثار توأم هیپرکسی نورموباریک متناوب و ایسکمی بر میزان بیان ژن آنزیم تبدیل کننده TNF- α و سطح TNF- α سرم.

روش بررسی

۱- گروه بندی حیوان آزمایشگاهی. رت‌های اسپیراگو-دالی (۳۸۰-۲۵۰ گرم) به طور تصادفی به چهار گروه حاوی ۲۱ حیوان تقسیم می‌شدند. دو گروه در درون جعبه اکسیژن با غلظت >90 تحت عنوان شرایط هیپرکسی قرار داده می‌شدند. از این دو گروه، یک گروه به صورت پیوسته (۲۴ ساعت) و دیگری به صورت متناوب (۴ ساعت در روز به مدت ۶ روز) در معرض اکسیژن با غلظت بالای ۹۰ درصد قرار می‌گرفتند (NBHO). دو گروه دیگر وضعیت مشابه با دو گروه اول داشتند با این تفاوت که یک گروه به صورت پیوسته (۲۴ ساعت) و دیگری به صورت متناوب (۴ ساعت در روز به مدت ۶ روز) در معرض اکسیژن ۲۱ درصد قرار می‌گرفتند (NBNO). حیوان‌ها سپس به مدت ۲۴ ساعت در هوای اتاق (۲۱ درصد) قرار می‌گرفتند. سپس هر کدام از این گروه‌ها به سه زیر گروه تقسیم می‌شدند. زیر گروه‌های اول به مدت ۶۰ دقیقه تحت جراحی انسداد شریان مرکزی (MCAO) قرار می‌گرفتند. ۲۴ ساعت بعد از لحاظ نقص‌های حرکتی نورولوژیک مورد مطالعه قرار می‌گرفتند. زیر گروه‌های دوم به عنوان گروه شم پروتوکل آزمایشی گروه اول را دریافت می‌کردند با این تفاوت که جراحی بدون MCAO در این حیوانات صورت می‌گرفت. زیر گروه‌های سوم به عنوان گروه دست نخورده پروتوکل آزمایشی گروه اول را دریافت می‌کردند با این تفاوت که هیچگونه جراحی در آنها صورت

نمی‌گرفت. این دو گروه برای بررسی اثر خالص پیش شرطی سازی با هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب بر میزان ژن آنزیم تبدیل کننده TNF- α و سطح TNF- α سرم طراحی شده بودند. علاوه بر این گروه دیگری بنام هیپرکسی نورموباریک متناوب با MCAO برای بررسی اثر توأم هیپرکسی نورموباریک متناوب و ایسکمی حاصل از MCAO در نظر گرفته شده بود. برای ارزیابی سطح TNF- α در زیر گروه‌های دوم و سوم، بلافاصله و ۴۸ ساعت بعد از پیش درمان با هیپرکسی نورموباریک خونگیری انجام می‌شد.

۲- جعبه هیپرکسی. ۹ رت در داخل یک جعبه که تمامی درزهای آن به طور کامل گرفته شده است در ابعاد (۳۰×۳۵×۶۵) با دو مجرای ورودی و خروجی قرار داده می‌شد. ماده‌ای بنام سودالیم^{۱۲} (جاذب دی اکسید کربن) در زیر جعبه قرار داده می‌شد تا دی اکسید کربن تولیدی را جذب کند. بدین ترتیب، امکان تغییر غلظت گاز داخل جعبه به حداقل می‌رسید. اکسیژن خالص (۰/۹۵) یا $F_iO_2=$ یا هوای اتاق در میزان ۳ لیتر در دقیقه برای تیمار جانوران به جعبه حاوی رت‌ها متصل می‌شد. برای افزایش دقت آزمایش یک الکتروود سنجش اکسیژن نیز در کنار جعبه تعبیه می‌شد تا غلظت اکسیژن داخل جعبه را اندازه گیری کند. آزمایش ABG در هر دو آزمایش صورت می‌گرفت.

۳- ایجاد مدل سکته مغزی (انسداد شریان مرکزی مغزی). رت‌های نر بالغ با داروی کلرال هیدرات با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن از طریق ip بیهوش می‌شدند. تحت عمل جراحی میکروسکوپی، شکافی در خط میانی گردن ایجاد می‌شد تا CCA^{۱۳} راست نمایان شود؛ این قسمت بین عضلات دی‌گاستریک^{۱۴} و استرنوماستوئید^{۱۵} قرار دارد و عضله اوموهیوئید^{۱۶} را تقسیم می‌کند. شریان پس سری که از ECA^{۱۷} منشعب می‌شود، جدا شد و بسته می‌شد. سپس، شریان فوقانی

¹²- soda lime

¹³- common carotid artery

¹⁴- digastric

¹⁵- sternomastoid

¹⁶- omohyoid

¹⁷- external carotid artery

بخیه نایلون بیرون نگاه داشته می‌شد تا امکان برقراری جریان خون مجدد وجود داشته باشد. بازگرداندن جریان خون MCA نیازی به بیهوش کردن نداشت. نخ بخیه به عقب کشیده می‌شد تا زمانی که مقاومت احساس نشود (۲۵).

۴- ارزیابی رفتاری حاصل از سکته. معاینه‌های نورولوژیک بعد از ۲۴ ساعت انجام می‌شد. در طول ۲۴ ساعت بعد از شروع انسداد تا قربانی شدن حیوان مراقبت‌های ویژه انجام می‌شد. یافته‌های نورولوژیکی در ۵ مقیاس دسته‌بندی می‌شدند: شماره صفر هیچگونه عارضه نورولوژیک نشان نمی‌دادند؛ شماره یک (نارسایی کامل در انتهای پنجه‌های جلویی)، که یک نقص نورولوژیک کانونی خفیف نشان می‌داد. شماره دو (به چپ چرخیدن) نقص نورولوژیک کانونی متوسط؛ شماره ۳ (افتادن به سمت چپ) نقص کانونی شدید داشتند؛ و رت‌های شماره ۴ به طور خود بخودی نمی‌توانستند راه بروند و سطح هوشیاری پایین داشتند.

۵- وسترن بلات. ابتدا برای هموژن کردن بافت مغز بافر هموژن را به صورت زیر آماده می‌کردیم. بافر حاوی ۳۲۰ میلی‌مولار سوکروز (مرک، آلمان)، یک میلی‌مولار دی-آل دی تیوتریتول^{۲۵}، ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مهار کننده تریپسین سویبین^{۲۶} (مرک، آلمان)، ۰/۲ درصد SDS (مرک، آلمان)، ۱۰۰ میکرومولار ۱، ۱۰- فنانترویلین^{۲۷} (مرک، آلمان)، یک درصد PMSF و ۵۰ میلی‌مولار تریس (بوهرینگ-مانهیم، آلمان) بود که در دمای ۲۰ درجه سلسیوس با HCl به pH ۷ رسانده می‌شد (۱).

در مرحله بعد حدود ۱۵۰ میلی‌گرم از بافت مغز (۴۸ ساعت بعد از پایان هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب یا نورموکسی نورموباریک) از ناحیه همسو با ناحیه آسیب مغزی را جدا کردیم. بافت جدا شده را در دمای ۴ درجه سلسیوس در ۴ حجم حاوی بافر هموژن قرار دادیم (۲۶). به واسطه دستگاه سونیکاتور به مدت ۱۰ ثانیه، ۵/ دور در ثانیه و دامنه ۶۰ درصد بافت مغزی را هموژن کردیم. سپس به مدت ۱۰ دقیقه بافر حاوی محلول هموژن را با

تیروئید و شریان صعودی حلقی نیز جدا می‌شد و کواگولیت^{۱۸} (بسته) می‌شد. آنگاه ECA در ناحیه انتهایی جدا شد و در طول شاخه‌های شریانی ماگزیلاری^{۱۹}، لینگوال انتهایی^{۲۰} کواگولیت می‌شدند. سپس، ICA به دقت از عصب مجاور جدا می‌شد. تشریح بعدی شناسایی اناسی^{۲۱} عصب زبانی حلقی در خاستگاه شریان پتریگوپالتین^{۲۲} بود؛ در این بخش شاخه مستقیم پشتی خارج جمجمه‌ای ICA با نخ بخیه نایلون نزدیک به خاستگاهش گره زده می‌شد. در این نقطه، ICA تنها شاخه خارج جمجمه‌ای باقیمانده CCA است.

سپس، نخ بخیه سیلک به طور سست پیرامون گنده ECA گره زده می‌شد، و یک کلیپ انحنایی زیر عروق هم در CCA و هم در ICA نزدیک خاستگاه ECA قرار داده می‌شد. یک نخ بخیه تک فیلامنتی ۰-۳ به طول ۵ سانتی‌متر، که نوک آن با گرم کردن توسط شعله گرد شده بود به داخل لومن ECA از طریق شاخه انتهایی ECA فرستاده می‌شد. نخ بخیه سیلک پیرامون گنده ECA به طور محکم از طریق نخ بخیه نایلون داخل لومینال برای جلوگیری از خونریزی قرار داده می‌شد و کلیپ (گیره) زیر عروق برداشته می‌شد. آنگاه، نخ بخیه نایلونی از طریق ECA به داخل لومن ICA فرستاده می‌شد. موقعیت نخ بخیه در لومن ICA تا زمانی که به قاعده جمجمه برسد، فرستاده می‌شد. بعد طولی حدود ۲۰ میلی‌متر از نخ بخیه به داخل گنده ECA فرستاده و مقاومتی در برابر ورود احساس می‌شد و انحنای اندک نخ بخیه یا کشیدگی ICA مشاهده می‌شد، که نشان می‌داد نوک گرد شده نخ بخیه از خاستگاه MCA^{۲۳} گذشته است و به قطعه ابتدایی شریان مغزی قدامی^{۲۴} (ACA) رسیده است، که دارای قطر کوچکتری است. در این نقطه، نخ بخیه داخل لومینال خاستگاه MCA را مسدود می‌کرد. بدین ترتیب، کلیه منابع جریان خون از ICA و ACA و شریان مغزی خلفی (PCA) بسته می‌شدند. یک سانتی‌متر نخ

18- coagulate

19- maxillary

20- lingual

21- ansa

22- pterygopalatine

23- middle cerebral artery

24- anterior cerebral artery

25- DL-dithiothreitol

26- soybean trypsin inhibitor

27- 1,10-phenanthroline

(Bander Medsystem, Austeria).

به طور خلاصه، بعد از شستشو با بافر نمونه، نمونه‌ها به چاهک‌ها به صورت نمونه و استاندارد اضافه شدند.

هر یک از چاهک‌های مزبور پوشیده از آنتی‌بادی ضد TNF- α بودند. سپس آنتی‌بادی ضد TNF- α متصل به بیوتین برای اتصال به TNF- α که به آنتی‌بادی ضد TNF- α تعلق دارد چاهک متصل است، اضافه شد. آنگاه به مدت یک ساعت انکوباسیون انجام شد.

سپس به واسطه بافر شستشو چاهک‌ها شسته می‌شدند. سپس استرپتوئیدین-HRP برای اتصال به آنتی‌بادی ضد TNF- α متصل به بیوتین اضافه شد. بعد از انکوباسیون، استرپتوئیدین-HRP غیر متصل شستشو می‌شدند و محلول سوبسترا حاوی تترامیل بنزیدین و ۰/۰۲٪ پراکسید هیدروژن برای واکنش با HRP به چاهک‌ها اضافه شد. واکنش به واسطه اضافه کردن اسید متوقف شد و غلظت TNF- α سرم به واسطه جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Start Fax-2100, USA).

۷- آنالیز آماری. سطح TNF- α و میزان بیان آنزیم تبدیل کننده TNF- α ، و میزان گازهای خون شریانی با استفاده از one-way ANOVA و آزمون t مورد آنالیز قرار گرفت. امتیازهای نقص نورولوژیک با استفاده از آزمون Mann-Whitney U مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. داده‌ها به صورت Mean \pm SEM نمایش داده شد. $P < 0/05$ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

۱- پارامترهای شرایط آزمایش. شکل ۱ محتوی اکسیژن داخل جعبه اکسیژن را در شرایط هیپرکسی و نورموکسی نورموباریک نشان می‌دهد.

بر اساس ارزیابی‌های آزمایش گازهای خون شریانی^{۳۱} (ABG) فشار اکسیژن شریانی در شرایط هیپرکسی بسیار بالاتر از فشار اکسیژن شریانی در شرایط نورموکسی است (جدول ۱-۲).

سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار دادیم. سپس، ۱۰ میکرولیتر محلول هموژن با بافر نمونه 2x مخلوط شده و به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد. ۴۰ میکروگرم از آن در روی چاهک‌های ژل لود می‌شد، همچنین نردبان وزن مولکولی پروتئینی (Fermentas, SM0671) به اندازه ۵ میکرولیتر در یکی از چاهک‌ها لود شد. پروتئین‌ها بر اساس اندازه در SDS-PAGE^{۲۸} ۱۰٪ جدا شدند.

قبل از اضافه کردن آنتی‌بادی‌های پروتئین‌های موردنظر، غشا PVDF به واسطه ماده بلوک کننده^{۲۹} (GE Health care,) (Amersham) به مدت یک ساعت بلوک شد. پروتئین‌ها بر روی غشای PVDF با آنتی‌بادی‌های پلی کلونال اختصاصی علیه آنزیم تبدیل کننده TNF- α (TACE) (Prosci-incorporated) با رقت ۱:۲۰۰۰ حاصل از خرگوش: یا با آنتی‌بادی اختصاصی علیه بتا-اکتین (Prosci-incorporated) به مدت یک ساعت انکوبه شدند.

آنزیم تبدیل کننده TNF- α و بتا-اکتین به واسطه آنتی‌بادی اختصاصی اولیه شناسایی شدند و به آنها اتصال یافتند. سپس آنتی‌بادی‌های ثانویه اختصاصی خرگوش متصل به HRP (Dakocytomation, Denmark) برای شناسایی آنتی‌بادی‌های علیه آنزیم تبدیل کننده TNF- α و بتا-اکتین با رقت ۱/۱۰۰۰۰ مورد استفاده قرار گرفت. انکوباسیون آنتی‌بادی ثانویه به مدت یک ساعت در دمای اتاق صورت گرفت. بعد از شستشوی غشای PVDF، مخلوطی از سوبسترای A, B (ECL, Amersham Biosciences) در تاریکی بر روی غشا اضافه شد و در اثر واکنش آنها با HRP^{۳۰} نور تولید شد. آنگاه فیلم حساس رادیولوژی را به مدت ۱ دقیقه بر روی بلات قرار دادیم تا فیلم رادیولوژی را متاثر سازد. بدین ترتیب وجود پروتئین آشکار می‌شد.

۶- آزمایش الیزا. بعد از خونگیری، بلافاصله سرم از لخته خونی جدا شد. تعیین غلظت TNF- α سرم توسط کیت الیزا TNF- α رت براساس دستورالعمل کیت انجام شد

²⁸- Sodium Dodecyl Sulfate polyacrilamid gel electrophoresis

²⁹- Blocking reagent

³⁰- Hourse radish peroxidase

³¹- Arterial blood gases

جدول ۱. پارامترهای فیزیولوژیک در پایان پیش‌درمان با هیپرکسی و نورموکسی

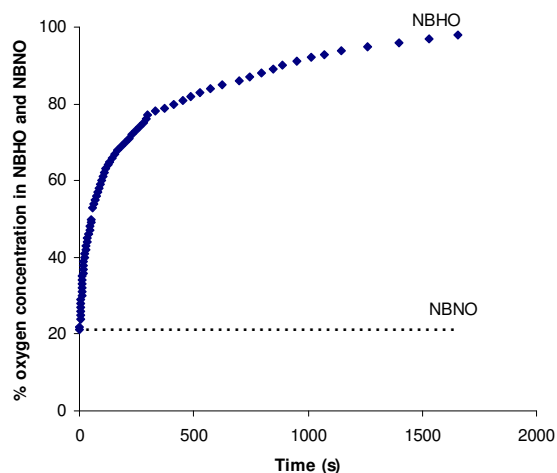
Experimental Groups	pH	PCO ₂ (mmHg)	PO ₂ (mmHg)	Respiratory Rate (Hz)
Intermittent NBNO	7.4±0.015	41.16±0.7	92.8±1.65	1.62±0.045
Intermittent NBHO	7.3±0.01	39.2±0.95	351.1±8.8***	1.37±0.06
Prolonged NBNO	7.37±0.02	40.2±0.65	93.2±2.6	1.60±0.055
Prolonged NBHO	7.35±0.01	37.8±1.19	363±7.15***	1.24±0.06

جدول ۲. توزیع امتیازهای نورولوژیک در هر گروه و مقایسه آماری آنها

No.	Experimental groups	NDS in each groups(N)					Total (N)	Median	Statistical results (P value)
		0	1	2	3	4			
1	Intermittent NBNO	0	3	4	1	1	9	2	1:2 sig. (P<0.05)
2	Intermittent NBHO	4	4	1	0	0	9	1	2:4 nonsig. (P>0.05)
3	Prolonged NBNO	0	3	5	1	0	9	2	4-3sig.(P<0.05)
4	Prolonged NBHO	3	4	2	0	0	9	1	-

همانطوری که ملاحظه می‌کنید مقایسه گروه‌های ردیف ۱، ۲، ۳، ۴، ۳، ۴، ۳، ۴ معنی‌دار است اما ۲، ۴ معنی‌دار نیست.

NDS: neurologic deficit score; N: the number of cases in each groups; sig: significant; nonsig: nonsignificant.

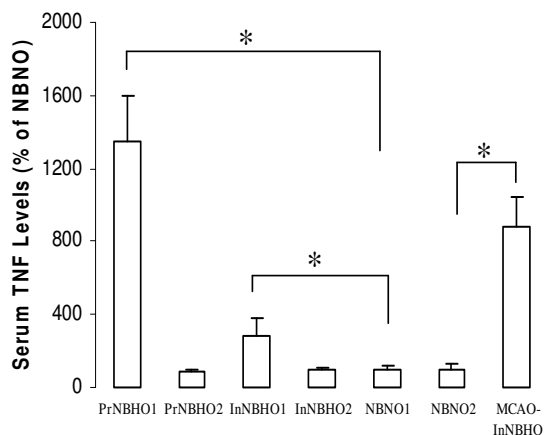


شکل ۱. تغییرات غلظت اکسیژن در واحد زمان در شرایط هیپرکسی نورموباریک (NBHO) و نورموباریک نورموکسی (NBNO).

علاوه بر این، اثر توام هیپرکسی نورموباریک متناوب و ایسکمی (MCAO-InNBHO) باعث افزایش غلظت TNF- α سرم می‌شود (شکل ۲)، اما ۴۸ ساعت بعد از هیپرکسی نورموباریک پیوسته (PrNBHO2) و متناوب (InNBHO2) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (NBNO2) افزایشی در غلظت TNF- α

۲- آثار هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب بر امتیازهای نقص نورولوژیک. میانه امتیازهای نقص نورولوژیک (NDS) به واسطه قرار گیری در معرض هیپرکسی نورموباریک به طور قابل ملاحظه کاهش می‌یابد. میانه امتیازهای نقص نورولوژیک در گروه‌های هیپرکسی نورموباریک متناوب و پیوسته و نورموکسی نورموباریک متناوب و پیوسته در جدول ۲ نشان داده شده است. در رت‌هایی که به واسطه قرار گرفتن در معرض هیپرکسی هیچ‌گونه نقص نورولوژیک مشاهده نشده بود، با تزریق اوانس آبی، این رنگ در ناحیه مرکزی سکنه مشاهده می‌شد. این مدرک نشان می‌دهد که در کلیه رت‌های مذکور انسداد شریان مرکزی مغز صورت گرفته است ولی به دلیل بروز پدیده تحمل به ایسکمی القایی هیپرکسی به ویژه در ناحیه پنومبرا استحکام سد خونی-مغزی افزایش یافته است.

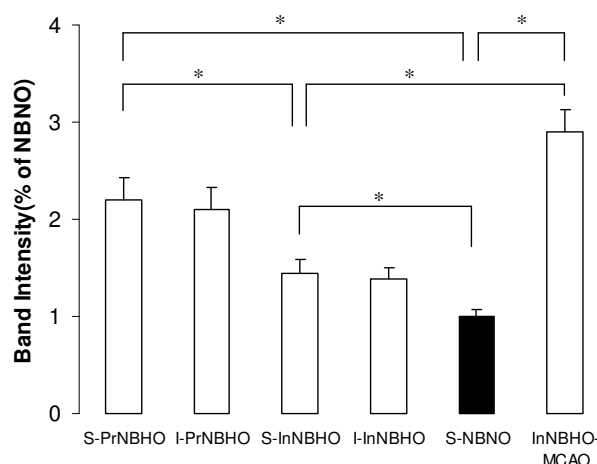
۳- آثار هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب بر سطح TNF- α سرم. شکل ۲ نشان می‌دهد که هیپرکسی نورموباریک پیوسته (PrNBHO1) و متناوب (InNBHO1) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (NBNO1) باعث افزایش غلظت TNF- α سرم می‌شوند.



شکل ۲. تغییرات سطح TNF- α سرم در گروه‌های هیپرسی نورموباریک (NBHO) و نورموکسی نورموباریک (NBNO) متناوب (In) و پیوسته (Pr) و هیپرسی نورموباریک متناوب توام با ایسکمی (MCAO-InNBHO) بلافاصله (NBHO1, NBHO2) و بعد از ۴۸ ساعت (NBNO1, NBNO2) از پایان هیپرسی و نورموکسی نورموباریک (*= $P < 0.01$).

سرم مشاهده نمی‌شود (شکل ۲). تفاوت آماری گروه‌های هیپرسی نورموباریک پیوسته (PrNBHO1) و متناوب (InNBHO1) معنی‌دار است و نشان می‌دهد که اثر هیپرسی نورموباریک پیوسته بر روی افزایش غلظت TNF- α سرم به طور قابل توجهی بیشتر است. تفاوت آماری گروه‌های هیپرسی نورموباریک پیوسته (PrNBHO1) و متناوب (InNBHO1) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (NBNO1) و هیپرسی نورموباریک متناوب توام با ایسکمی (MCAO-InNBHO) نسبت به گروه نورموکسی نورموباریک (NBNO1) از لحاظ آماری معنی‌دار است (شکل ۲، $P < 0.01$).

۴- آثار هیپرسی نورموباریک پیوسته و متناوب بر میزان بیان ژن آنزیم تبدیل‌کننده TNF- α . شکل ۳ نشان می‌دهد که هیپرسی نورموباریک پیوسته (S-PrNBHO) و متناوب (S-InNBHO) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (S-NBNO) باعث افزایش بیان ژن آنزیم تبدیل‌کننده TNF- α می‌شود.



شکل ۳. آنالیز وسترن بلات مقایسه میزان بیان آنزیم تبدیل‌کننده TNF- α (TACE) در مغز رت‌های گروه شم (S-PrNBHO) و گروه دست نخورده (I-PrNBHO) هیپرسی نورموباریک پیوسته، گروه شم (S-InNBHO) و گروه دست نخورده (I-InNBHO) هیپرسی نورموباریک متناوب، گروه شم نورموکسی نورموباریک (S-NBNO)، و اثر توام ایسکمی (MCAO) و هیپرسی نورموباریک متناوب را نشان می‌دهد. مقادیر دانسیته باندها به واسطه میزان دانسیته بتا-اکتین نورمالیزه شده است (*= $P < 0.01$).

پدیده تحمل به ایسکمی را نشان نمی‌دهند و با تزریق رفتگرهای ROS دقیقاً قبل از ۲۴ ساعت هیپرکسی نورموباریک پیوسته، پدیده تحمل به ایسکمی نشان داده نشده است (۱۱). نتایج این پژوهش با نتایج ژانگ و همکارانش همخوانی دارد. بنابراین، هیپرکسی نورموباریک پیوسته احتمالاً با افزایش ROS مسیر پیام‌رسانی سلولی پیش‌شرطی‌سازی ایسکمی را به راه می‌اندازد.

در این مسیر احتمالاً ROS به واسطه حسگرهای اکسیژن مانند گیرنده بنزودیازپین (MBR) یا HIF حس می‌گردد و با فعال‌سازی HIF³² باعث افزایش بیان ژنهای پیش‌شرطی‌سازی در سلول می‌شوند (۲۷). همان طوری که ذکر شد، MBR همولوژی بسیار زیادی با پروتئین غنی از تریپتوفان (TspO) باکتریایی دارد و به عنوان حسگر اکسیژن عمل می‌کند. از طرف دیگر، گزارش شده است که هیپوکسی باعث افزایش نفوذپذیری گذرای میتوکندریایی (MPT) می‌گردد (۲۸). علاوه بر این که هیپوکسی باعث آزادسازی مقادیر زیادی نوروتوکسیک گلوتامات می‌شود که به طور غیرقابل برگشت مرگ نورونی را شروع می‌کند و در این میان نقش MPT اساسی است. بنابراین آزادسازی ROS، اعمال MBR، فرایند MPT و آزادسازی نوروتوکسیک گلوتامات رابطه تنگاتنگی دارند. هیپرکسی نورموباریک نیز احتمالاً با به راه انداختن عوامل مذکور پدیده تحمل به ایسکمی را به وجود می‌آورد.

در پژوهش قبل نشان دادیم که هیپرکسی نورموباریک متناوب باعث ایجاد تحمل به ایسکمی در مغز می‌شود (۳۵). همچنین نشان داده شد که ۴ ساعت هیپرکسی نورموباریک منفرد پدیده تحمل به ایسکمی را در مغز نشان نمی‌دهد (۱۱). دونگ و همکارانش نشان داده‌اند که پیش‌درمان با هیپرکسی هیپراریک (۲/۵ اتمسفر) و هیپرکسی نورموباریک به صورت یک ساعت در روز به مدت ۵ روز باعث ایجاد پدیده تحمل به ایسکمی در نخاع خرگوش شده است (۱۲). نتایج پژوهش حاضر نتایج دونگ و همکارانش را تایید می‌کند. بنابراین، تحمل به ایسکمی در بافت‌های مغزی مورد آزمایش بر اساس مدت زمان و مقدار غلظت اکسیژن متفاوت خواهد بود. کمیت و کیفیت تجویز اکسیژن در

علاوه بر این، اثر توام هیپرکسی نورموباریک متناوب و ایسکمی (MCAO-InNBHO) باعث افزایش بیان آنزیم تبدیل‌کننده TNF- α شده است. تفاوت آماری گروه‌های هیپرکسی نورموباریک پیوسته (PrNBHO1) و متناوب (InNBHO1) معنی‌دار است و نشان می‌دهد که اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته بر روی افزایش بیان ژن آنزیم تبدیل‌کننده TNF- α به‌طور قابل توجهی بیشتر است. تفاوت آماری گروه‌های مذکور نسبت به گروه شم نورموکسی نورموباریک معنی‌دار است.

بحث

برای ایجاد شرایط هیپرکسی یا نورموکسی نورموباریک معتبر، در داخل جعبه اکسیژن یک فشارسنج به منظور کنترل مداوم فشار بارومتریک برای حصول شرایط نورموباریک تعبیه شده بود. از طرف دیگر یک اکسیژن‌سنج و دما‌سنج برای کنترل مداوم دما و محتوی اکسیژن برای حصول شرایط هیپرکسی در نظر گرفته شده بود. علاوه بر این، برای تایید شرایط هیپرکسی و نورموکسی در پایان پیش‌درمان رت‌های داخل جعبه اکسیژن، تعدادی از آنها مورد سنجش گازهای خون شریانی قرار گرفته بودند. نتایج افزایش قابل توجه فشار اکسیژن را نشان می‌دادند و نتایج گازهای خون شریانی با نتایج سایر مقالات منتشر شده در زمینه هیپرکسی همخوانی داشته است (۱۱). بنابراین هدف تحقیق مبنی بر ایجاد شرایط هیپرکسی در خون شریانی تامین می‌گردید.

براساس نتایج این مطالعه که در شرایط استاندارد و با استفاده از مدل جراحی معتبر و قابل تکرار MCAO لونگا و همکارانش (۲۵) در ایجاد مدل سکتی مغزی استفاده شده است، نشان داده شده است که هیپرکسی نورموباریک پیوسته به علت کاهش امتیاز نقص نورولوژیک در اثر ۶۰ دقیقه ایسکمی در مقایسه با گروه نورموکسی نورموباریک، باعث ایجاد قابلیت تحمل به ایسکمی شده است. ژانگ و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۳ با انجام این آزمایش پدیده تحمل به ایسکمی بعد از ۲۴ ساعت هیپرکسی نورموباریک پیوسته را گزارش کرده‌اند (۱۱). همچنین گزارش کرده‌اند که هیپرکسی نورموباریک پیوسته کمتر از ۲۴ ساعت

³²- Hypoxia induced factor

ایسکمی می‌شود و توان بقای سلولهای عصبی را افزایش می‌دهد. علیرغم نتایج مطلوبی که استفاده از هیپرکسی نورموباریک در ایجاد تحمل به ایسکمی دارد، استفاده از آن باید با دقت و رعایت شرایط خاص صورت گیرد تا از ایجاد عوارض نامطلوب پرهیز شود. زیرا هیپرکسی نورموباریک پیوسته دارای آثار جانبی و خواص سمی است (۳۳). نتایج سایر محققین نشان می‌دهد که هیپرکسی نورموباریک پیوسته کمتر از ۲۴ ساعت آثار تحمل به ایسکمی را نشان نمی‌دهد (۱۱).

شواهد نشان می‌دهد که قرار گرفتن در معرض اکسیژن ۹۵٪ به مدت ۲۴ ساعت منجر به احتقان شدید ریوی می‌شود که در آن گلوبولهای قرمز خون، ادم و تغییر در ساختمان آلئولی اتفاق می‌افتد. حتی بعد از ۲ هفته نیز بهبودی ساختمان آلئولی کامل نمی‌شود. بنابراین تجویز اکسیژن به صورت پیوسته منجر به اختلال عملکردی ریه‌ها می‌شود (۳۳). مدارک دیگر نشان می‌دهد که پدیده حفاظت^{۳۳} در حیواناتی که در معرض هیپوکسی پیوسته قرار می‌گیرند در مقایسه با حیواناتی که هیپوکسی متناوب (اکسیژن رسانی مجدد و مکرر) را تجربه می‌کنند قوی‌تر بروز می‌کند (۳۴).

نتیجه‌گیری

بنابراین با در نظر گرفتن نتایج فوق هیپرکسی متناوب، سمیت کم و آثار تحمل به ایسکمی نیز القا می‌کند.

در این تحقیق مقایسه نتایج دو روش پیوسته و متناوب نشان داد که هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب موجب کاهش امتیاز نقص نورولوژیک در اثر سکتة مغزی می‌شوند. همچنین نشان داده شده است که هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب هر دو موجب افزایش بیان ژن TACE می‌شوند. از طرف دیگر افزایش بیان ناقلین گلوتامات با افزایش غلظت TNF- α سرم رابطه مستقیم دارد.

لذا، استفاده از شیوه هیپرکسی نورموباریک متناوب به علت آثار سمی کمتر باید بیشتر مورد توجه قرار گیرد، هر چند کارهای تحقیقاتی بیشتری برای تایید آن مورد نیاز است.

القای تحمل به ایسکمی، عوارض جانبی، و مسمومیت‌های آن بر روی بدن اهمیت دارد.

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب باعث افزایش غلظت TNF- α سرم می‌شود. از طرف دیگر، هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب باعث افزایش بیان ژن آنزیم تبدیل‌کننده TNF- α می‌شود. تاکنون گزارشی مبنی بر افزایش بیان ژن آنزیم تبدیل‌کننده TNF- α به واسطه هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب در مغز نشان داده نشده است. اما شواهدی وجود دارد که میزان بیان آنزیم تبدیل‌کننده TNF- α (TACE) بعد از ایسکمی مغزی افزایش می‌یابد. بدین ترتیب باعث افزایش آزادسازی TNF- α می‌گردد و در صورتی که مهارکننده TACE مورد استفاده قرار گیرد، پدیده تحمل به ایسکمی نیز دیده نمی‌شود (۲۳). همچنین نشان داده شده است که اگر TNF- α به صورت پیش‌درمان استفاده شود می‌تواند پدیده تحمل به ایسکمی را به وجود آورد (۲۹). از طرف دیگر گزارش شده است که مهار TNF- α ، فعال‌سازی کسپاز ۳ با واسطه هیپرکسی را در سلولهای ریوی نوع ۲ مهار می‌کند (۳۰). همچنین نشان داده شده است که TNF- α بیان‌ناقل گلوتامات نوع ۲ و نوع ۳ را افزایش می‌دهد (۱). همچنین TNF- α گرفتن گلوتامات را بعد از تجویز LPS بالا می‌برد (۳۱). علاوه بر این، اثبات شده است که TNF- α هم بیان و هم عملکرد ناقلین مواد مختلف را می‌افزاید (۳۲). بنابراین نتایج این پژوهش با نتایج سایر محققین همخوانی دارد.

با توجه به نتایج فوق برخی نشان‌دهنده‌اند که TNF- α به عنوان یک میانجی کلیدی در پدیده تحمل به ایسکمی عمل می‌کند (۲۲).

همچنین نشان داده شده است که در پیش‌شرطی سازی ایسکمی میزان بیان ژن TACE افزایش می‌یابد (۲۳). بنابراین، مکانیسم احتمالی که می‌توان در این زمینه پیش‌بینی کرد آن است که هیپرکسی باعث تولید TNF- α می‌گردد. سپس TNF- α از طریق گیرنده خود باعث به راه افتادن مسیر پیام‌رسانی NF- κ B در داخل سلول می‌شود (۱،۲۳). آنگاه فاکتور نسخه‌برداری NF- κ B باعث افزایش بیان گروهی از ژنهای پیش‌شرطی سازی

33- protection

References

1. Romera C, Hurtado O, Botella S, Lizasoain I, Cardenas A, Fernandez-Tome P, Leza J, Lorenzo P, Moro M. In Vitro Ischemic Tolerance Involves Upregulation of Glutamate Transport Partly Mediated by the TACE/ADAM17-Tumor Necrosis Factor- α Pathway. *J Neurosci* 2004; 24(6):1350–1357.
2. Gidday JM, Fitzgibbons JC, Shah AR, Park TS. Neuroprotection from ischemic brain injury by hypoxic preconditioning in the neonatal rat. *Neurosci Lett*. 1994; 168: 221– 224.
3. Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, Handa N, Fukunaga R, Kimura K, Mikoshiba K. Ischemic tolerance phenomenon found in the brain. *Brain Res*. 1990; 528: 21–24.
4. Plamondon H, Blondeau N, Heurteaux C, Lazdunski M., Mutually protective actions of kainic acid epileptic preconditioning and sublethal global ischemia on hippocampal neuronal death: involvement of adenosine A1 receptors and KATP channels. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 1296–1308.
5. Perez-Pinzon MA, Mumford PL, Rosenthal M, Sick TJ. Anoxic preconditioning in hippocampal slices: role of adenosine. *Neuroscience* 1996; 75: 687–694.
6. Matsushima K, Hogan MJ, Hakim AM. Cortical spreading depression protects against subsequent focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16: 221–226.
7. Chopp M, Chen H, Ho KL, Dereski MO, Brown E, Hetzel FW, Welch KM. Transient hyperthermia protects against subsequent forebrain ischemic cell damage in the rat. *Neurology* 1989; 39: 1396–98.
8. Ohtsuki T, Matsumoto M, Kuwabara K, Kitagawa K, Suzuki K, Taniguchi N, Kamada T. Influence of oxidative stress on induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *Brain Res* 1992; 599: 246–252.
9. Patel AJ, Honore´ E, Maingret F, Lesage F, Fink M, Duprat F, Lazdunski M. A mammalian two pore domain mechanogated S-type K⁺ channel. *EMBO J* 1998; 17: 4283–4290.
10. Riepe MW, Esclaire F, Kasischke K, Schreiber S, Nakase H, Kempinski O, Ludolph AC, Dirnagl U, Hugon J. Increased hypoxic tolerance by chemical inhibition of oxidative phosphorylation: “chemical preconditioning.” *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17: 257–264.
11. Zhang X, Xiong L, Hu W, Zheng Y, Zhu Z, Liu Y, Chen S, Wang X. Preconditioning with prolonged oxygen exposure induces ischemic tolerance in the brain via oxygen free radical formation. *CAN J ANESTH* 2004; 51(3): 258–263.
12. Dong H, Xiong L, Zhenghua Z, Chen S, Hou L, Sakabe T. Preconditioning with hyperbaric oxygen and hyperoxia induce tolerance against spinal cord ischemia in rabbits. *Anesthesiology* 2002; 96: 907-12.
13. Downey JM, Cohen MV, Ytrehus K, Liu Y. Cellular mechanisms in ischemic preconditioning: the role of adenosine and protein kinase C. *Ann*

- NY Acad Sci 1994; 723: 82–98.
- 14.** Baxter GF. Ischaemic preconditioning of myocardium. *Ann Med* 1997; 29: 345–352.
- 15.** Carroll R and Yellon DM. Myocardial adaptation to ischaemia – the preconditioning phenomenon. *Int J Cardiol* 1999; 68: S93–S101.
- 16.** Edwards RJ, Saurin AT, Rakhit RD and Marber MS. Therapeutic potential of ischemic preconditioning. *Br J Clin Pharmacol* 2000; 50: 87–97.
- 17.** Barone FC, Feuerstein GZ. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 819–834.
- 18.** Shohami E, Ginis I, Hallenbeck JM. Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999; 10: 119–130.
- 19.** Del Zoppo G, Ginis I, Hallenbeck JM, Iadecola C, Wang X, Feuerstein GZ. 2000. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathol* 2000; 10: 95–112.
- 20.** Hallenbeck JM. The many faces of tumor necrosis factor in stroke. *Nat Med* 2002; 8: 1363–1368.
- 21.** Liu J, Ginis I, Spatz M, Hallenbeck JM. Hypoxic preconditioning protects cultured neurons against hypoxic stress via TNF- α and ceramide. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278: C144–C153.
- 22.** Wang X, Li X, Erhardt JA, Barone FC, Feuerstein GZ. Detection of TNF- α mRNA induction in ischemic brain tolerance by means of realtime polymerase chain reaction. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20: 15–20.
- 23.** Hurtado O, Lizasoain I, Fernandez-Tome P, Alvarez-Barrientos A, Leza JC, Lorenzo P, Moro MA. TACE/ADAM17-TNF- α pathway in rat cortical cultures after exposure to oxygen-glucose deprivation or glutamate. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 576–585.
- 24.** Pradillo J, Hurtado O, Romera C, Cardenas A, Fernandez-Tome P, Alonso-Escolano D, Lorenzo P, Moro M, Lizasoain I. TNF-R1 mediates increased neuronal membrane EAAT3 expression after in vivo cerebral ischemic preconditioning. *J Neurosci* 2006; 26: 1171–1178.
- 25.** Longa E, Weinstein P, Carlson S, Cummins R. Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion without Craniectomy in Rats. *Stroke* 1989; 20: 84–91.
- 26.** Hurtado O, Lizasoain I, Fernandez-Tome P, Alvarez-Barrientos A, Leza JC, Lorenzo P, Moro MA. TACE/ADAM17-TNF- α pathway in rat cortical cultures after exposure to oxygen-glucose deprivation or glutamate. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 576–585.
- 27.** Biton R. and Booker G. The subtle side to hypoxia inducible factor (HIF- α) regulation. *Eur J Biochem* 2003; 270: 791–798.
- 28.** Kinnally KW, Zorov DB, Antonenko YN, Snyder SH, McEnery MW, Tedeschi H. Mitochondrial benzodiazepine receptor linked to inner membrane ion channels by nanomolar actions of ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 1374–1378.
- 29.** Liu J, Ginis I, Spatz M, Hallenbeck JM. Hypoxic preconditioning protects cultured neurons against

- hypoxic stress via TNF- α and ceramide. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278: C144–C153.
- 30.** Guthmann F, Wissel H, Schachtrup C, Tölle A, Rüdiger M, Spener F Rüstow B. Inhibition of TNFalpha in vivo prevents hyperoxia-mediated activation of caspase 3 in type II cells. *Respir Res* 2005; 6(10): 1-16.
- 31.** Rosenzweig HL, Minami M, Lessov NS, Coste SC, Stevens SL, Henshall DC, Meller R, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Endotoxin preconditioning protects against the cytotoxic effects of TNFalpha after stroke: a novel role for TNFalpha in LPS-ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; in press.
- 32.** Mochizuki T, Satsu H, Shimizu M. Tumor necrosis factor alpha stimulates taurine uptake and transporter gene expression in human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Lett* 2002; 517: 92–96.
- 33.** Al-Motabagani M. Histological changes in the alveolar structure of the lung after exposure to hyperoxia. *Ital J Anat Embryol* 2005; 110(4): 209-23.
- 34.** Milano G, Corno A, Lippa S, Segesser L, and Samaja M. Chronic and intermittent hypoxia induces different degrees of myocardial tolerance to hypoxia-induced dysfunction. *Exp Biol Med* 2002; 227(6): 389-397.
- 35.** Bigdeli M R, Hajizadeh S, Froozandeh M, Rasulian B, Heidarianpour A Khoshbaten A,. Prolonged and intermittent normobaric hyperoxia induce different degrees of ischemic tolerance in rat brain tissue. *Brain Res* 2007; 1152: 228-233.