

## بررسی میزان بیان ناقلین گلوتامات و سطح فعالیت NF-kB در پدیده تحمل به ایسکمی حاصل از هیپرکسی نورموباریک متناوب در مدل رت سکنه مغزی

محمد رضا بیگدلی<sup>\*</sup> Ph.D، علی خوش باطن<sup>\*</sup> Ph.D

### چکیده

**هدف:** مطالعات اخیر بیان می‌کند که هیپرکسی نورموباریک (HO) متناوب و پیوسته باعث ایجاد پدیده تحمل به ایسکمی به منظور کاهش آسیب‌های مغزی حاصل از ایسکمی می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی اثر هیپرکسی متناوب به تنهایی و هیپرکسی متناوب توأم با ایسکمی بر تغییرات بیان ناقلین اسیدهای آمینه تحریکی (EAATs) و سطح فعالیت NF-kB است.

**مواد و روش‌ها:** رت‌ها به دو گروه آزمایشی تقسیم می‌شدند و هر گروه حاوی حدود ۲۰ حیوان بود. گروه اول به صورت متناوب (۴ ساعت در روز به مدت ۶ روز) در معرض اکسیژن ۹۵٪ قرار می‌گرفتند (InHO). گروه دوم به عنوان گروه کنترل همانند گروه اول به صورت متناوب (۴ ساعت در روز به مدت ۶ روز) در معرض اکسیژن ۲۱٪ (هوای اتاق) قرار می‌گرفتند (InRA). هر گروه به سه زیرگروه بنام زیرگروه انسداد شریان مرکزی مغز (MCAO)، زیرگروه گروه شم MCAO (جراحی بدون ایسکمی MCAO)، و زیرگروه دست نخورده (بدون هیچ گونه جراحی) تقسیم می‌شدند. بعد از ۲۴ ساعت برقراری جریان خون مجدد بعد از ۶۰ دقیقه ایسکمی، میزان نقص نورولوژیک (NDS) در زیرگروه MCAO بررسی می‌شد. بلافاصله و ۴۸ ساعت بعد از پیش درمان، نمونه گیری به منظور اندازه‌گیری سطح فعالیت NF-kB انجام می‌شد. بدین ترتیب اثر HO و ایسکمی بر روی تغییرات بیان ناقلین اسیدهای آمینه تحریکی (EAATs)، و سطح فعالیت NF-kB مورد سنجش قرار می‌گرفت.

**یافته‌ها:** پیش شرطی سازی با HO و ایسکمی متناوب باعث کاهش میزان نقص نورولوژیک می‌شود. پیش درمان با HO متناوب باعث افزایش بیان ناقلین اسیدهای آمینه تحریکی، و سطح فعالیت NF-kB می‌شود.

**نتیجه‌گیری:** اگرچه مطالعات بیشتری برای وضوح مکانیسم‌های تحمل به ایسکمی لازم است، اما HO متناوب و ایسکمی ظاهراً تا حدی آثارشان را از طریق افزایش بیان ناقلین اسیدهای آمینه تحریکی و سطح فعالیت NF-kB انجام می‌دهند.

**واژه‌های کلیدی:** هیپرکسی نورموباریک، تحمل به ایسکمی مغزی، سکنه مغزی، ناقلین اسیدهای آمینه تحریکی، سطح فعالیت

NF-kB

## مقدمه

اصلی مانورهای پیش شرطی سازی به ایسکمی هستند. از طرف دیگر، مطالعات نشان می‌دهد که TNF-a نقش مهمی در ایجاد پدیده تحمل به ایسکمی ایفا می‌کند (۳۰). TNF-a توسط پروتئاز غشایی موسوم به آنزیم تبدیل کننده TNF-a به حالت محلول در می‌آیند.

نشان داده شده است که پیش شرطی سازی با هیپرکسی نورموباریک متناوب و پیوسته باعث ایجاد درجات متفاوت پدیده تحمل به ایسکمی در مغز رت می‌شوند (۱۳). بدین ترتیب، در این مطالعه اثر هیپرکسی نورموباریک متناوب به تنهایی و هیپرکسی توام با ایسکمی بر تغییرات بیان ناقلین اسیدهای آمینه تحریکی (EAATs)، و فعالیت NF-kB مورد بررسی قرار می‌گیرند.

## مواد و روشها

### ۱- گروه بندی حیوان آزمایشگاهی

رت‌های اسپیراگو-دالی (۳۵۰-۲۵۰ گرم) به طور تصادفی به دو گروه حاوی ۲۰ حیوان تقسیم می‌شدند. گروه اول در درون جعبه اکسیژن با غلظت بالای ۹۰ درصد تحت عنوان شرایط هیپرکسی قرار داده می‌شدند. به طوری که به صورت متناوب (۴ ساعت در روز به مدت ۶ روز) در معرض اکسیژن بالای ۹۰ درصد قرار می‌گرفتند (InHO). گروه دیگر وضعیت مشابه با گروه اول داشتند با این تفاوت که به صورت متناوب (۴ ساعت در روز به مدت ۶ روز) در معرض اکسیژن ۲۱ درصد قرار می‌گرفتند (InRA). 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 هیچ گونه جراحی در آنها صورت نمی‌گرفت. این دو گروه برای بررسی اثر خالص پیش

تحریکات آسیب رسان در دوزهای پایین و کم، البته زیر آستانه‌ی آسیب رسان به سلول، پاسخ سازشی القا می‌کند که مغز را در برابر استرس‌های دیگر حاصل از همین تحریکات آسیب رسان (تحمل<sup>۱</sup>) یا دیگر تحریکات آسیب رسان (تحمل متقابل<sup>۲</sup>) حفاظت می‌کند (۱). در بین استرس‌های مختلف، هیپرکسی (۲)، ایسکمی (۳)، تشنج (۴)، آنوکسی (۵)، افسردگی منتشر<sup>۳</sup> (۶)، گرما (۷)، استرس اکسیداتیو (۸)، تیمار با اسیدهای چرب اشباع نشده (۹)، و مهارکننده‌های فسفوریلاسیون اکسیداتیو (۱۰) فرایند تحمل مغز در برابر ایسکمی<sup>۴</sup> (کامل یا کانونی) را القا می‌کنند. اکثر این تحریکات به علت آثار سمی فاقد پتانسیل پیاده سازی بالینی هستند. به همین دلیل تحریکات غیر فارماکولوژیکی برای ایجاد پدیده تحمل به ایسکمی بیشتر مورد توجه قرار گرفته اند. یکی از این تحریکات غیر فارماکولوژیکی هیپرکسی است. اخیراً چندین گزارش وجود دارد که هیپرکسی نیز باعث بروز تحمل به ایسکمی می‌شود (۱۱، ۱۲، ۱۳).

مکانیسم‌های احتمالی متعددی در القا و حفظ پدیده تحمل به ایسکمی در مغز پیشنهاد شده اند. مکانیسم‌های مولکولی احتمالی شامل انواع وسیعی از میانجی‌هایی هستند که القای پروتئین‌های شوک گرمایی (۱۴)، گیرنده‌های NMDA (۱۵، ۱۶، ۱۷)، فاکتورهای آنتی آپوپتیک (۱۸)، اینتر لوکین-۱ (۱۹)، گیرنده‌های آدنوزینی و کانال‌های پتاسیمی وابسته به ATP (۲۰)، سوپراکسید دیسموتاز (۲۱)، گونه‌های اکسیژن واکنشی (ROS) (۲۲)، فعال سازی p21ras وابسته به نیتریک اکسید (۲۳)، متالوتیونین‌ها (۲۴)، فعال سازی گیرنده فاکتور رشد اندوتلیالی عروق و Akt (۲۵)، اریتروپویتین (۲۶)، کسپاز-۳ (۲۷)، و سایتوکین‌های پیش التهابی و NF-kB (۲۸) از این جمله اند.

در نهایت، نشان داده شده است که حفاظت عصبی حاصل از محرومیت به اکسیژن و گلوکز از افزایش گلوتامات خارج سلولی جلوگیری می‌کند و بازگیری گلوتامات از طریق افزایش بیان ناقلین گلوتامات افزایش می‌یابد (۱، ۲۹). بنابراین، ناقلین گلوتامات هدف

- 1 Tolerance
- 2 Cross tolerance
- 3 Spreading depression
- 4 Ischemic tolerance

۶۰ دقیقه ایسکمی، برقراری مجدد جریان خون صورت می‌گرفت. دمای بدن از طریق رکتوم اندازه‌گیری و میزان دمای در حوالی ۳۷ درجه حفظ می‌شد.

#### 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 نورولوژیک در ۵ مقیاس دسته‌بندی می‌شوند: شماره صفر (۰) هیچ‌گونه عارضه نورولوژیک نشان نمی‌دادند؛ شماره یک (نارسایی کامل در انتهای پنجه‌های جلویی)، که یک نقص نورولوژیک کانونی خفیف در نظر گرفته می‌شود. شماره دو (به چپ چرخیدن) نقص نورولوژیک کانونی متوسط؛ شماره ۳ (افتادن به سمت چپ) نقص کانونی شدید هستند؛ و رت‌های شماره ۴ به طور خود بخودی نمی‌توانند راه بروند و سطح هوشیاری پایین دارند.

#### ۵- آنالیز وسترن بلات ناقلین گلوتامات

ابتدا برای هموژن کردن بافت مغز بافر هموژن را به صورت زیر آماده می‌کردیم. بافر حاوی ۳۲۰ میلی مولار سوکروز (مرک، آلمان)، یک میلی مولار دی-آل دی تیوتریتول<sup>۱۰</sup>، ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر مهارکننده تریپسین سویبین<sup>۱۱</sup> (مرک، آلمان)، ۲٪، درصد SDS (مرک، آلمان)، ۱۰۰ میکرومولار ۱،۱۰- فنانترویلین<sup>۱۲</sup> (مرک، آلمان)، یک درصد PMSF و ۵۰ میلی مولار تریس (بوهرینگ-مانهیم، آلمان)، بود که در دمای ۲۰ درجه سلسیوس با HCl به pH ۷ رسانده می‌شد (۳).

در مرحله بعد حدود ۱۵۰ میلی گرم از بافت مغز (۴۸ ساعت بعد از پایان هیپرکسی پیوسته و متاوب یا نورموکسی) از ناحیه همسو با ناحیه آسیب مغزی را جدا می‌کردیم. بافت جدا شده را در دمای ۴ درجه سلسیوس در ۴ حجم حاوی بافر هموژن قرار می‌دادیم (۶۰). سپس ۴۰ میکروگرم از آن را در روی چاهک‌های ژل لود می‌کردیم، همچنین نردبان وزن مولکولی پروتئینی (Fermentas, SM0671)

شرطی سازی با هیپرکسی نورموباریک متناوب بر میزان بیان آنزیم تبدیل‌کننده (TACE) TNF-a و سطح Phospho-IκBα طراحی شده بودند. برای ارزیابی سطح Phospho-IκBα در زیر گروه‌های دوم و سوم، بلافاصله و ۴۸ ساعت بعد از پیش درمان با هیپرکسی نورموباریک نمونه‌گیری انجام می‌شد.

#### ۲- جعبه هیپرکسی

۹ رت در داخل یک جعبه که تمامی درزهای آن به طور کامل گرفته شده است در ابعاد (۶۵'۳۵'۳۰) با دو مجرای ورودی و خروجی قرار داده می‌شدند. ماده ای بنام سودا لیم<sup>۵</sup> (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 (FIO<sub>2</sub> = ۰/۹۵) 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 اندازه‌گیری کند. آزمایش ABG در هر دو آزمایش صورت می‌گرفت.

#### ۳- ایجاد مدل سکته مغزی (انسداد شریان مرکزی مغز)

رت‌ها بعد از توزین با داروی کلرات هیدرات (مرک، آلمان) (۴۰۰ میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن) هوشبری می‌شدند. جراحی مدل سازی MCAO مطابق دستورالعمل لونگا و همکارانش انجام می‌شد (۳۱). به طور خلاصه، تحت جراحی میکروسکوپی، یک نخ بخیه نایلون از طریق تنه ECA<sup>۶</sup> وارد رگ می‌شد و تا رسیدن به ACA<sup>۷</sup> از میان ICA<sup>۸</sup> با پتریگوبالاتین بسته‌ای داده می‌شد. در اثر تماس نخ بخیه و ACA جریان خون از هر طرف به MCA<sup>۹</sup> بسته می‌شد. این بسته شدن از طریق احساس مقاومت و در پیشروی نخ و ورود حدود ۲۰ میلی متر طول نخ از تنه ECA مشخص می‌شد. بعد از

5 soda lime  
6 External carotid artery  
7 Anterior cerebral artery  
8 Internal carotid artery  
9 Middle cerebral artery

10 DL-dithiothreitol  
11 soybean trypsin inhibitor  
12 1,10-phenanthroline

## ۶- آزمایش الیزا Phospho-I $\kappa$ B $\alpha$

بعد از نمونه گیری مغزی، Phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  به واسطه کیت اندازه گیری Phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  بر اساس دستورالعمل کیت انجام می شد (Alexis, Biochemicals). به طور خلاصه، ۵ میلی گرم از بافت مغزی ناحیه همسو در نیمکره غیر ایسکمی در محلول بافر فسفات سرد در دمای ۴ درجه جدا می شد و دو بار به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ می شد. سپس حجم معادلی از بافر لیز کننده به حجم بافت اضافه می شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه انکوبه می شد. آنگاه، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ می شد. محلول سوپرناتانت برای اندازه گیری غلظت پروتئین جمع آوری می شد. محلول سلولهای لیز شده تا غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر در بافر بلوک کننده رقیق می شد. سپس آنتی بادی آشکار کننده در محلول بلوک کننده با رقت ۱:۲۰۰ اضافه می شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه می شد. بعد از شستشو Strep-HRP با رقت ۱:۱۰۰۰ اضافه می شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه می شد. بعد از شستشو، محلول سوبسترا به چاهکها اضافه می شد و در فاصله ۲ تا ۱۰ دقیقه بعد از افزودن سوبسترا میزان نور تولیدی توسط لومیناتور (Chemiluminescence Immunoassay analyzer, China) اندازه گیری می شد.

## ۷- تحلیل نتایج و روشهای آنالیز آماری

داده ها به صورت Mean $\pm$ SEM بیان شده است. غلظت Phospho-I $\kappa$ B $\alpha$ ، میزان بیان ناقلین گلوتامات، و گازهای خونی شریانی از طریق one-way ANOVA test و t-test محاسبه شده اند. امتیاز نقص های نورولوژیک با استفاده از Mann-Whitney U test آنالیز شده است.  $P < 0,05$  معنی دار در نظر گرفته شده است.

## نتایج

### ۱- پارامترهای شرایط آزمایش

بر اساس ارزیابی های آزمایش گازهای خونی شریانی<sup>۱۶</sup> (ABG) فشار

به اندازه ۵ میکرولیتر در یکی از چاهکها لود می شد. پروتئینها بر اساس اندازه در SDS-PAGE<sup>۱۳</sup> ۱۰٪ جدا می شدند.

قبل از اضافه کردن آنتی بادی های پروتئین های مورد نظر، غشای PVDF به واسطه ماده بلوک کننده<sup>۱۴</sup> (GE Health care, Am-ersham) به مدت یک ساعت بلوک می شد. پروتئینها بر روی غشای PVDF با آنتی بادی های پلی کلونال اختصاصی علیه ناقل گلوتامات نوع ۱ (EAAT1/GLAST) (Covalab, UK Ltd) با رقت ۱:۲۰۰۰ حاصل از خرگوش؛ یا با آنتی بادی های پلی کلونال اختصاصی علیه ناقل گلوتامات نوع ۲ (EAAT2/GLT-1) (Covalab, UK Ltd) با رقت ۱:۲۰۰۰ حاصل از خرگوش؛ یا با آنتی بادی های پلی کلونال اختصاصی علیه ناقل گلوتامات نوع ۳ (EAAT3/EAAC1) (Chemicon) با رقت ۱:۲۰۰۰ حاصل از بز؛ یا با آنتی بادی اختصاصی علیه بتا-اکتین (Prosci-incorporated) به مدت یک ساعت انکوبه می شدند.

ناقلین گلوتامات و بتا-اکتین به واسطه آنتی بادی اختصاصی اولیه شناسایی می شدند و به آنها اتصال می یافتند. سپس آنتی بادی های ثانویه اختصاصی خرگوش متصل به HRP (Dakocytomation, Denmark) برای شناسایی آنتی بادی های علیه ناقلین گلوتامات ۱ و ۲ و بتا-اکتین با رقت ۱/۱۰۰۰۰ و آنتی بادی های ثانویه اختصاصی بز متصل به HRP (RAY-بیوتک، ایران) برای شناسایی آنتی بادی های علیه ناقل گلوتامات نوع ۳ با رقت ۱/۱۰۰۰ مورد استفاده قرار می گرفت. انکوباسیون آنتی بادی ثانویه به مدت یک ساعت در دمای اتاق صورت می گرفت.

بعد از شستشوی غشای PVDF مخلوطی از سوبسترای A, B (ECL, Amersham Biosciences) در تاریکی بر روی غشا اضافه می شد و در اثر واکنش آنها با HRP<sup>۱۵</sup> نور تولید می شد. آنگاه فیلم حساس رادیولوژی را به مدت ۱ دقیقه بر روی بلات قرار می دادیم تا فیلم رادیولوژی را متاثر سازد. بدین ترتیب وجود پروتئین آشکار می شد.

13 Sodium Dodecyl Sulfate polyacrilamid gel electrophoresis

14 Blocking reagent

15 Hourse radish peroxidase

16 Arterial blood gases

جدول ۱- وضعیت گازهای خون شریانی و تنفسی در پایان تیمار با هیپرکسی نورموباریک

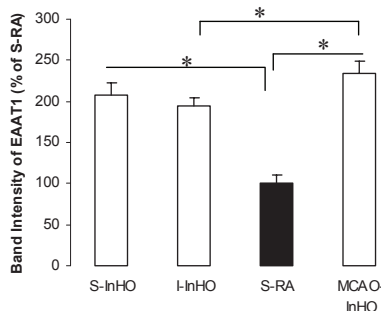
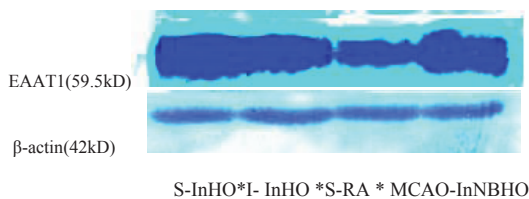
گروه‌های آزمایشی	pH	PCO2 (mmHg)	PO2 (mmHg)	میزان تنفس (هر تنز)
RA متناوب	۷/۴±۰/۰۳	۴۱/۱۶±۱/۴	۹۲/۸±۳/۳	۱/۶۳±۰/۰۹
HO متناوب	۷/۳±۰/۰۲	۳۹/۲±۱/۹	۳۵۱/۱±۱۷/۶	۱/۳۷±۰/۱۲

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

همانطوری که ملاحظه می‌کنید مقایسه گروه‌های ردیف ۱:۲ است.

شماره گروه‌های آزمایشی	تعداد نقص‌های نورولوژیک در هر گروه						نتایج آماری (مقدار P)
	۰	۱	۲	۳	۴	۵	
۱ RA متناوب	۰	۲	۴	۲	۰	۰	۱:۲ معنی دار (P<۰,۰۵)
۲ HO متناوب	۳	۳	۱	۰	۰	۰	

در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (S-RA) باعث افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع یک می‌شوند. اثر توام هیپرکسی نورموباریک متناوب و ایسکمی (MCAO-InHO) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک باعث افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع یک شده است. تفاوت آماری گروه‌های مذکور معنی دار است (شکل ۱).



شکل ۱: آنالیز وسترن بلات ناقل گلوتامات شماره یک در گروه شم (S) و دست نخورده (I) هیپرکسی نورموباریک متناوب به تنهایی (InHO) و هیپرکسی نورموباریک متناوب توام با ایسکمی (MCAO-InHO) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (RA).

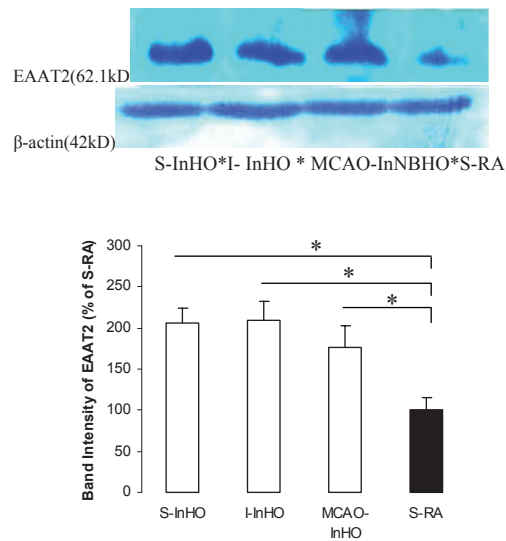
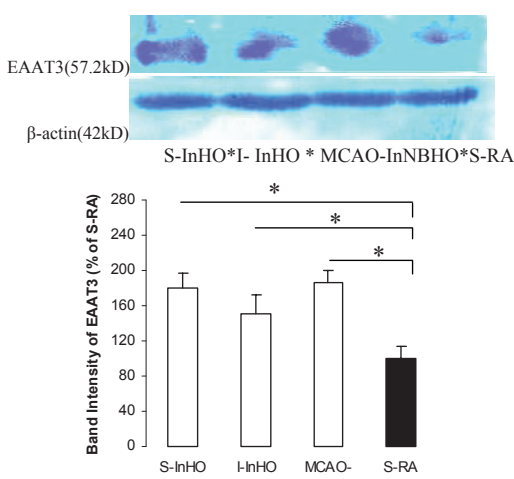
اکسیژن شریانی در شرایط هیپرکسی بسیار بالاتر از فشار اکسیژن شریانی در شرایط نورموکسی است (جدول ۱).

## ۲- آثار هیپرکسی نورموباریک متناوب بر امتیازهای نقص نورولوژیک

میان‌ه امتیازهای نقص نورولوژیک (NDS) به واسطه قرارگیری در معرض هیپرکسی نورموباریک به طور قابل ملاحظه کاهش می‌یابد. میان‌ه امتیازهای نقص نورولوژیک در گروه‌های هیپرکسی نورموباریک متناوب و نورموکسی نورموباریک متناوب و در جدول ۲ نشان داده شده است. در رت‌هایی که به واسطه قرار گرفتن در معرض هیپرکسی هیچ گونه 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- اثر هیپرکسی نورموباریک متناوب و هیپرکسی نورموباریک متناوب توام با ایسکمی بر بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۱

شکل ۱ نشان می‌دهد که هیپرکسی نورموباریک متناوب (S-InHO)



شکل ۳: آنالیز وسترن بلات ناقل گلوتامات شماره ۳ در گروه شم (S) و دست نخورده (I) هیپرکسی نورموباریک متناوب به تنهایی (InHO) و هیپرکسی نورموباریک متناوب توام با ایسکمی (MCAO-InHO) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (RA).

شکل ۲: آنالیز وسترن بلات ناقل گلوتامات شماره دو در گروه شم (S) و دست نخورده (I) هیپرکسی نورموباریک متناوب به تنهایی (InHO) و هیپرکسی نورموباریک متناوب توام با ایسکمی (MCAO-InHO) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (RA).

باعث افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع سه شده است. تفاوت آماری گروه‌های مذکور در مقایسه با نورموکسی نورموباریک معنی دار است (شکل ۳).

۴- اثر هیپرکسی نورموباریک متناوب و هیپرکسی نورموباریک متناوب توام با ایسکمی بر بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۲

شکل ۲ نشان می‌دهد که هیپرکسی نورموباریک متناوب (S-InHO) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (S-RA) باعث افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۲ می‌شوند. اثر توام هیپرکسی نورموباریک متناوب و ایسکمی (MCAO-InHO) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک باعث افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع دو شده است. تفاوت آماری گروه‌های مذکور در مقایسه با نورموکسی نورموباریک معنی دار است (شکل ۲).

۶- اثر هیپرکسی نورموباریک متناوب و پیوسته، و هیپرکسی نورموباریک متناوب توام با ایسکمی بر غلظت Phospho-I $\kappa$ B $\alpha$

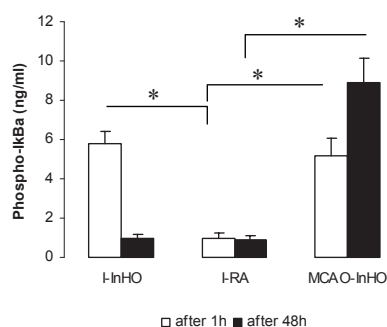
شکل ۴ نشان می‌دهد که هیپرکسی نورموباریک متناوب (I-InHO) بلافاصله بعد از پیش درمان، در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (I-RA) باعث افزایش غلظت Phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  می‌شوند. اثر توام هیپرکسی نورموباریک متناوب و ایسکمی (MCAO-InHO) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک و هیپرکسی نورموباریک متناوب باعث افزایش غلظت Phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  شده است. هیپرکسی نورموباریک متناوب (I-InHO) بعد از ۴۸ ساعت از پیش درمان، در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (I-RA) بر تغییر غلظت Phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  معنی‌دار نیست. تفاوت آماری گروه‌های مذکور در مقایسه با نورموکسی نورموباریک معنی‌دار است (شکل ۴).

۵- اثر هیپرکسی نورموباریک متناوب و هیپرکسی نورموباریک متناوب توام با ایسکمی بر بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۳

شکل ۳ نشان می‌دهد که هیپرکسی نورموباریک متناوب در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (S-RA) باعث افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۳ می‌شوند. اثر توام هیپرکسی نورموباریک متناوب و ایسکمی (MCAO-InHO) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک

باعث افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع یک، دو، و سه می‌شود. تاکنون گزارشی مبنی بر ایجاد تحمل به ایسکمی به واسطه افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع یک، دو، و سه از طریق هیپرکسی در مغز منتشر نشده است. اما نشان داده شده است که در اثر پیش شرطی سازی ایسکمی از طریق دوره‌های کوتاه ایسکمی در شرایط *in vitro* (۲۹) میزان بیان ژن ناقل گلوتامات نوع یک افزایش می‌یابد. اما در شرایط *in vivo* نشان داده شده است (۲۹) که میزان بیان ژن ناقل گلوتامات نوع یک در اثر دوره‌های کوتاه ایسکمی تغییر نمی‌کند. از طرف دیگر، یاماشیتا و همکارانش در شرایط *in vivo* نقش ناقلین گلوتامات نوع ۴ و ۱ (EAAT4 و EAAT1) را در سلول‌های پورکنژ مخچه موش جهش یافته بعد از آسیب حاصل از ایسکمی مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که موش‌های جهش یافته ناقل گلوتامات نوع ۱ نسبت به موش‌های جهش یافته ناقل گلوتامات نوع ۴ آسیب‌پذیرتر بودند (۳۳). نتایج مزبور نشان می‌دهد که ناقل گلوتامات نوع ۱ نقش مهمی در جلوگیری از بروز آثار سمی حاصل از تحریک<sup>۱۷</sup> می‌تواند داشته باشد. بنابراین، یکی از عوامل کاهش میزان نقص‌های نورولوژیک و ایجاد پدیده تحمل به ایسکمی افزایش ناقل گلوتامات نوع ۱ است. گزارش شده است که میزان ناقل گلوتامات نوع ۱ به واسطه مهار گیرنده  $TNF-\alpha$  تغییر پیدا نمی‌کند (۲۹). این مطلب نشان می‌دهد که افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۱ در مسیر پیام‌رسانی  $TNF-\alpha$  قرار ندارد.

از طرف دیگر، گزارش شده است که ناقل گلوتامات نوع ۲ ( $GLT1/EAAT2$ ) بعلت مسوولیت اساسی که در بازگرداندن گلوتامات دارد، نقش مهمی در قشر مغز ایفا می‌کند (۳۴). حذف ژنتیکی ناقل گلوتامات نوع ۲ به مقدار زیادی باعث افزایش گلوتامات خارج سلولی، آسیب نورونی و ادم مغزی بعد از ایسکمی مغزی می‌شود (۳۵). بنابراین، افزایش میزان بیان ناقل گلوتامات نوع ۲ ممکن است در جلوگیری از آسیب مغزی ناشی از ایسکمی مفید باشد. همچنین، نشان داده شده است که  $TNF-\alpha$  بیان EAAT2/  $GLT1$  را افزایش می‌دهد و گرفتن گلوتامات را بعد از تجویز



شکل ۴: آنالیز الیزا Phospho-IkBa در گروه هیپرکسی نورموباریک متناوب به تنهایی (InHO) و هیپرکسی نورموباریک متناوب با ایسکمی (MCAO-InHO) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (RA).

## بحث

مدل MCAO به واسطه نخ بخیه ایجاد می‌شود و یک مدل مطمئن و قابل تکرار در مدل‌های حیوانی سگته مغزی است (۳۲). شرایط فیزیولوژیک در طی آزمایش در محدوده طبیعی نگاه داشته می‌شود. البته، در گروه‌های هیپرکسی به علت غلظت بالای اکسیژن، محتوی اکسیژن افزایش می‌یافت و فرکانس تنفس کاهش می‌یافت. بر اساس نتایج این مطالعه 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 کرده اند (۱۱). در پژوهش‌های قبل نشان داده شده است که هیپرکسی نورموباریک متناوب باعث ایجاد تحمل به ایسکمی در مغز می‌شود (۱۳). همچنین نشان داده شده است که ۴ ساعت هیپرکسی نورموباریک منفرد پدیده تحمل به ایسکمی را در مغز نشان نمی‌دهد (۱۱). نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که هیپرکسی نورموباریک متناوب

ایسکمی را وساطت کند. (۳) استفاده از روش هیپرکسی نورموباریک متناوب برای القای پدیده تحمل به ایسکمی مناسب تر است. لذا، استفاده از هیپرکسی نورموباریک یا طراحی موادی که قادر به تقلید از آثار هیپرکسی نورموباریک در افزایش بیان و فعالیت ناقلین گلوتامات باشند، روش و استراتژی جدیدی در پیدایش داروها به وجود خواهد آورد که در به حداقل رساندن آسیب‌های نورونی طی ایسکمی مغزی یا حین پیشروی بیماری‌های مزمن تحلیل عصبی درگیر با اثر سمی ناشی از تحریک کمک خواهد کرد.

## 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- $\alpha$  Pathway. *J Neurosci* 2004; 24:1350-7.
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: 221-4.
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; 528:21-4.
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

بالا می‌برد(۳۶). بنابراین، افزایش بیان ناقل گلوتامات نوع ۲ می‌تواند به عنوان یکی از عوامل ایجاد کننده پدیده تحمل به ایسکمی مطرح باشد. یافته‌های این تحقیق نیز با یافته‌های محققین مذکور همخوانی دارد. نشان داده شده است که میزان بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۲ به واسطه مهار گیرنده TNF- $\alpha$  تغییر نمی‌کند(۲۹). همچنین شواهدی وجود دارد که ناقل گلوتامات نوع ۳ بعد از ایسکمی ناشی از MCAO دچار تنظیم افزایشی می‌شوند. افزایش بیان ناقل گلوتامات نوع ۳ بعد از ایسکمی ممکن است تا حدی به تولید TNF- $\alpha$  و مسیر (TACE/TNF- $\alpha$ ) وابسته باشد (۲۹ و ۱). نتایج این تحقیق نیز نشان می‌دهد که تغییرات TNF- $\alpha$  و میزان بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۳ رابطه مستقیم دارند.

مطالعات نشان می‌دهد که اکسیژن رسانی مجدد منجر به انفجار تولید ROS می‌شود و متیوکندری به عنوان منبع تولید و حسگر ROS محسوب می‌شود(۳۷). افزایش ROS حاصل از جریان خون مجدد باعث افزایش آسیب بافتی و موجب افزایش تولید TNF- $\alpha$  و سایر سیتوکین‌ها می‌شود. بدین ترتیب TNF- $\alpha$  از طریق گیرنده خود احتمالاً به واسطه فعال سازی NF- $\kappa$ B میزان بیان ژن ناقلین گلوتامات را در سلول‌های عصبی افزایش می‌دهد (۲۹ و ۱). در مجموع، Phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  ممکن است آثار دیگری نیز از طریق مسیرهای دیگر اعمال کند و باعث القای بیان ژن سایر ژن‌های پیش شرطی سازی شود. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که ناقل گلوتامات نوع ۳ در شرایط هیپرکسی نورموباریک متناوب افزایش می‌یابد و این افزایش با افزایش غلظت Phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  رابطه مستقیم دارد. همان طوری که ذکر شد نتایج سایر محققین نیز با نتایج این پژوهش همخوانی دارد.

## نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد: (۱) هیپرکسی نورموباریک متناوب تحمل به ایسکمی را به وجود می‌آورد و باعث کاهش میزان نقص نورولوژیک می‌شوند. (۲) هیپرکسی نورموباریک متناوب و هیپرکسی نورموباریک متناوب توام با ایسکمی بیان ناقلین گلوتامات را در درجات مختلف افزایش می‌دهند. این اثر تا حدی می‌تواند تحمل به



13. Bigdeli MR, 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: 228-33.
14. Kirino T, Tsujita Y, Tamura A. Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991; 11: 299-307.
15. Kato H, Araki T, Murase K, Kogure K. Induction of tolerance to ischemia: alterations in second-messenger systems in the gerbil hippocampus. *Brain Res Bull* 1992; 29:559-65.
16. Grabb MC, Choi DW. Ischemic tolerance in murine cortical cell culture: critical role for NMDA receptors. *J Neurosci* 1999; 19:1657-62.
17. Kasischke K, Ludolph AC, Riepe MW. NMDA antagonists reverse increased hypoxic tolerance by preceding chemical hypoxia. *Neurosci Lett* 1996; 214: 175-8.
18. Shimazaki K, Ishida A, Kawai N. Increase in bcl-2 oncoprotein and the tolerance to ischemia-induced neuronal death in the gerbil hippocampus. *Neurosci Res* 1994; 20:95-9.
19. 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: 246-52.
20. Heurteaux C, Lauritzen I, Widmann C, Lazdunski M. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors and KATP channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4666-70.
21. of adenosine. *Neuroscience* 1996. 75: 687-94.
22. Matsushima K, Hogan MJ, Hakim AM. Cortical spreading depression protects against subsequent focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16:221-6.
23. 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. *Neurol* 1989; 39:1396-8.
24. 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: 246-52.
25. Patel AJ, Honore' E, Maingret F, Lesage F, Fink M, Duprat F, Lazdunski M. A mammalian two pore domain mechanogated S-type K<sup>+</sup> channel. *EMBO J* 1998; 17: 4283-90.
26. 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: 257-64.
27. 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: 258-63.
28. 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. *Anesthesiol* 2002; 96: 907-12.

- Caspase 3 activation is essential for neuroprotection in preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:715–20.
28. Mattson MP, Culmsee C, Yu Z, Camandola S. Roles of nuclear factor kappa B in neuronal survival and plasticity. *J Neurochem* 2000; 74:443–56.
29. Pradillo J, Hurtado O, Romera C, Cardenas A, Fernandez-Tome P, Alonso-Escolano D, Lorenzo P, Moro M, Lizasoain. TNF-R1 mediates increased neuronal membrane EAAT3 expression after in vivo cerebral ischemic preconditioning. *J Neurosci* 2006; 26:1171–8.
30. Liu J, Ginis I, Spatz M, Hallenbeck JM. Hypoxic preconditioning protects cultured neurons against hypoxic stress via TNF- $\alpha$  and ceramide. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278: 144–53.
31. Longa E, Weinstein P, Carlson S, Cummins R. Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion without Craniectomy in Rats. *Stroke* 1989; 20: 84-91.
32. Dittmar M, Spruss T, Schuierer G, Horn M. External carotid artery territory ischemia impairs outcome in the endovascular filament model of middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 2003; 34: 2252-7.
33. Yamashita A, Makita K, Kuroiwa T, Tanaka K. Glutamate transporters GLAST and EAAT4 regulate postischemic Purkinje cell death: An in vivo study using a cardiac arrest model in mice lacking GLAST or EAAT4. *Neurosci Res* 2006; 55: 264–70.
34. Robinson MB. The family of sodium-dependent glutamate transporters: a focus on the GLT-1/EAAT2 subtype. *Neurochem Int* 1998; 33: 479–91.
35. Namura S, Maeno H, Takami S, Jiang XF, Kamichi S, Wada K, Nagata I. Inhibition of glial glutamate
21. Toyoda T, Kassell NF, Lee KS. Induction of ischemic tolerance and antioxidant activity by brief focal ischemia. *Neuro Report* 1997; 8:847–51.
22. Ravati A, Ahlemeyer B, Becker A, Klumpp S, Kriegelstein J. Preconditioning-induced neuroprotection is mediated by reactive oxygen species and activation of the transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B. *J Neurochem* 2001; 78:909–19.
23. Gonzalez-Zulueta M, Feldman AB, Klesse LJ, Kalb RG, Dillman JF, Parada LF, Dawson TM, Dawson VL. Requirement for nitric oxide activation of p21 (ras)/extracellular regulated kinase in neuronal ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:436–41.
24. Trendelenburg G, Prass K, Priller J, Kapinya K, Polley A, Muselmann C, Ruscher K, Kannbley U, Schmitt AO, Castell S, Wiegand F, Meisel A, Rosenthal A, Dirnagl U. Serial analysis of gene expression identifies metallothionein-II as major neuroprotective gene in mouse focal cerebral ischemia. *J Neurosci* 2002; 22:5879–88.
25. Wick A, Wick W, Waltenberger W, Weller M, Dichgans J, Schulz JB. Neuroprotection by hypoxic preconditioning requires sequential activation of vascular endothelial growth factor receptor and Akt. *J Neurosci* 2002; 22:7415-21.
26. Ruscher K, Freyer D, Karsch M, Isaev N, Megow D, Sawitzki B, Priller J, Dirnagl U, Meisel A. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. *J Neurosci* 2002; 22:10291–301.
27. McLaughlin BA, Hartnett KA, Erhardt KA, Legos JL, White RF, Barone FC, Aizenman E.

transporter GLT-1 augments brain edema after transient focal cerebral ischemia in mice. *Neurosci Lett* 2002; 324: 117–20.

36. 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.

37. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124–36.

