

مجله علوم پزشکی مدرس
دوره ۱۱، شماره ۱ و ۲: از ۲۳-۴۳
بهار و تابستان ۱۳۸۷

بررسی اثر پیش شرطی سازی با هیپرکسی نورموباریک بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در مدل سگته مغزی رت

محمد رضا بیگدلی^{۱*}، علی اکبر مرآتان^۲

۱- استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۲- دانشجوی دکتری، گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۸۷/۷/۱۴

تاریخ دریافت: ۸۷/۶/۱۰

چکیده

هدف: پیش شرطی سازی به ایسکمی یکی از پدیده‌های درون‌زاد است که می‌تواند توسط عوامل مختلف و از مسیرهای مولکولی متفاوت در بافت‌های مختلف مغز ایجاد شود. در این مطالعه اثر پیش شرطی سازی به واسطه هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب بر میزان نقص نورولوژیک، حجم سگته مغزی و میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: رت‌ها در چهار گروه به صورت گروه‌های پیوسته (۲۴ ساعت پیوسته) و متناوب (۴ ساعت در روز به مدت ۶ روز) در معرض هیپرکسی نورموباریک و نورموکسی نورموباریک (RA یا هوای اتاق) قرار می‌گرفتند. هر گروه به سه زیرگروه تقسیم شدند. زیرگروه اول، بعد از ۲۴ ساعت، تحت جراحی انسداد شریان میانی مغز به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفتند و سپس ۲۴ ساعت به آن‌ها اجازه برقراری مجدد جریان خون داده شد. زیرگروه دوم و سوم به نام زیرگروه شم (بدون انسداد شریان میانی مغز) و گروه دست‌نخورده (بدون جراحی) برای بررسی اثر هیپرکسی نورموباریک بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در نظر گرفته شد.

نتایج: یافته‌های ما نشان می‌دهد که هیپرکسی نورموباریک متناوب و پیوسته در القای تحمل به ایسکمی درگیر هستند. پیش‌درمان با هیپرکسی نورموباریک پیوسته یا متناوب نقص‌های نورولوژیک را بهبود می‌بخشد، حجم سگته مغزی را در گروه متناوب تا ۷۲٪ و در گروه پیوسته ۶۵٪ درصد کاهش می‌دهد و میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را به‌طور معنی‌دار افزایش می‌دهد. **نتیجه‌گیری:** اگرچه برای شناخت مکانیسم حفاظت عصبی حاصل از هیپرکسی نورموباریک مطالعات زیادی لازم است، اما نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که در رت هیپرکسی نورموباریک آثار حفاظت عصبی خود را تا حدی از طریق افزایش میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نشان می‌دهد.

کلیدواژگان: پیش شرطی سازی به ایسکمی، میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، سگته مغزی، هیپرکسی نورموباریک.

۱- مقدمه

آسیب‌رسان (تحمل: Tolerance) یا دیگر تحریکات
آسیب‌رسان (تحمل متقابل: Cross tolerance) حفاظت می‌کند
[۱]. در بین استرس‌های مختلف، هیپوکسی (Hypoxia) [۲].

تحریکات آسیب‌رسان در دوزهای پایین و کم، البته زیر
آستانه‌ی آسیب‌رسان به سلول، پاسخ سازشی القاء می‌کند که
مغز را در برابر استرس‌های دیگر حاصل از همین تحریکات

* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی، گروه فیزیولوژی، صندوق پستی: ۱۹۸۳۹۶۳۱۱۳.
Email: bigdelimohammadreza@yahoo.com

نشان می‌دهد که آسیب حاصل از تحریک (Excitotoxicity) باعث مرگ سلولی در برخی از نورون‌ها می‌شود [۲۲]. پژوهش‌ها نشان می‌دهند که آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان باعث مهار مرگ سلولی می‌شوند. بنابراین، مرگ سلولی نورون ممکن است نقش مهمی در آسیب عصبی حاصل از مدل ایسکمی کانونی مغزی داشته باشد [۲۳]. بنابراین، تلاش‌های زیادی برای تقویت دستگاه آنتی‌اکسیدان برای جلوگیری از آسیب مغزی انجام شده است. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را می‌توان با روش‌های مختلف استرس سلولی مانند ایسکمی و برقراری مجدد جریان خون خفیف [۲۴]، استرس گرمایی [۱۲]، میانجی‌های التهابی [۲۵] و اکسیژن‌دهی هیپرباریک (Hyperbaric Oxygenation) [۳] افزایش داد. پژوهش‌های انجام شده فوق نشان داده است که استرس خفیف ایسکمی بیان mRNA چندین ژن را افزایش می‌دهد. از میان آن‌ها می‌توان به ژن کاتالاز (Catalase: CAT) اشاره کرد که نیم ساعت بعد از استرس ایسکمی به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد [۵]. از طرف دیگر در برخی از آزمایش‌ها نشان داده شده است که فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در سرکوب آسیب‌های ایسکمی و برقراری مجدد جریان خون دخالت دارند. این امر نشان می‌دهد که در حقیقت افزایش ظرفیت آنزیم آنتی‌اکسیدان آثار تحمل به آسیب‌های ایسکمی را القاء می‌کند [۲۶].

آنزیم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان شامل SOD, CAT, گلوکاتایون پراکسیداز (Glutathione peroxidase: GPOX) و گلوکاتایون ردوکتاز (Glutathione reductase: GR) است. SOD یک متالوآنزیم است که دیسموتاسیون (Dismutation) آنیون سوپراکسید (O_2^-) به اکسیژن (O_2) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) را در سیتوزول، میتوکندری و هسته انجام می‌دهد [۲۷]. به دنبال آن H_2O_2 به‌واسطه آنزیم GPOX در سیتوزول به آب احیاء می‌شود. GPOX, SOD, و CAT توأم با گلوکاتایون اس-ترانسفراز (Glutathione S-transferase: GST) و GR به سهولت توسط عوامل اکسیداتیو القاء می‌شوند و سطوح فعالیت آنزیم‌های مذکور برای اندازه‌گیری استرس اکسیداتیو در سلول استفاده می‌شود [۲۸].

اکسیداسیون گروه‌های سولفو هیدریل سیستئین در دو مولکول گلوکاتایون (Glutathione: GSH) با تشکیل

ایسکمی (Ischemia) [۳]، تشنج [۴]، آنوکسی (Anoxia) [۵]، افسردگی منتشر (Spreading depression) [۶]، گرما [۷]، استرس اکسیداتیو (Oxidative stress) [۸]، تیمار با اسیدهای چرب اشباع نشده [۹]، و مهارکننده‌های فسفوریلاسیون اکسیداتیو (Oxidative Phosphorylation) [۱۰] فرایند تحمل مغز در برابر ایسکمی (Ischemic tolerance) (کامل یا کانونی) را القاء می‌کنند. چندین گزارش وجود دارد که نشان می‌دهد هیپرکسی (Hyperoxia) نیز باعث بروز تحمل به ایسکمی می‌شود [۱۱]، [۱۲]. مطالعات نشان می‌دهد که تحمل به ایسکمی در مغز به‌واسطه افزایش ستر پروتئین‌های خاص توان بقای نورون را افزایش می‌دهد از میان آن‌ها می‌توان به پروتئین شوک گرمایی ۷۰ (Heat shock protein 70: HSP70) [۱۳]، B cell lymphoma-2 (Bcl2) [۱۴]، ناقلین گلوتامات [۱۵]، سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase: SOD) [۱۶]، فاکتورهای ضد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (Antiapoptosis) [۵]، گونه‌های واکنشی اکسیژن (Reactive Oxygen Species: ROS) [۱۷]، فاکتور هسته‌ای کاپا B (Nuclear Factor-kappa B: NF-kB) و سایتوکین‌های (Cytokines) پیش‌التهابی [۱۸] اشاره کرد. یکی از تظاهرات بالینی آسیب دستگاه عصبی مرکزی (Central nervous system: CNS) بعد از ایسکمی مغزی تشکیل ادم مغزی ناشی از شکستن سد خونی-مغزی (Blood-brain barrier: BBB) است که به‌واسطه پیش‌شرطی‌سازی با هیپرکسی نورموباریک (HO) قابل بهبودی است [۱۹]. آنزیم SOD ادم مغزی وازوژنیک (Vasogenic cerebral edema) بعد از انواع آسیب‌ها را کاهش می‌دهد [۱۷]، این امر بیان می‌کند که رادیکال اکسیژن نقش مهمی در شکستن BBB ایفا می‌کند. تظاهرات دیگر تخریب CNS آسیب مستقیم به سلول عصبی است که به‌واسطه وقایع تحریکی، آزادسازی گلوتامات بعد از ایسکمی مغزی را القاء می‌کنند. این آسیب نیز به‌واسطه پیش‌شرطی‌سازی با هیپرکسی نورموباریک (HO) از طریق افزایش میزان بیان ناقلین گلوتامات کاهش می‌یابد [۲۰]. گلوتامات غلظت کلسیم آزاد داخل سلول [۲] را افزایش می‌دهد و در نتیجه آنزیم‌های وابسته به کلسیم افزایش می‌یابد و منجر به تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود [۲۱]. مطالعات

پیوند دی سولفید برای ایجاد دی سولفید گلوپروتئین (Glutathione disulfide: GSSG) به همدیگر متصل می‌شوند. GR بازگشت گلوپروتئین به حالت اولیه یعنی از GSSG به GSH از طریق احیای آن را کاتالیز می‌کند [۲۹]. GSH و GSSG از لحاظ زیست‌شناسی به‌عنوان تیول‌های داخل سلولی اهمیت زیادی دارد و تغییرات نسبت بین GSH و GSSG غالباً به‌عنوان شاخص استرس اکسیداتیو مورد استفاده قرار می‌گیرند [۲۹].

نویسندگان حاضر طی پژوهش‌های قبل نشان داده‌اند که قرارگرفتن متناوب و پیوسته در معرض HO پدیده تحمل به ایسکمی را القاء می‌کند و باعث افزایش بیان نافلین گلوتامات، سطوح فاکتور نکروز تومور آلفا (Tumor Necrosis Factor-alpha: TNF- α) سرم، و آنزیم تبدیل‌کننده TNF- α (TNF- α Converting Enzyme: TACE) در مغز رت می‌شود [۲۰، ۲۱]. هیپرکسی نورومباریک متناوب (Intermittent HO: InHO) موجب کاهش ادم مغزی و افزایش استحکام BBB نیز می‌شود [۵].

هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین پدیده تحمل به ایسکمی حاصل از HO بر میزان فعالیت آنزیم SOD و کاهش آسیب حاصل از سکته مغزی در رت است.

۲-۲- جعبه هیپرکسی

رت در داخل یک جعبه که تمامی درزهای آن به‌طور کامل گرفته شده است در ابعاد (۶۵×۳۵×۳۰) با دو مجرای ورودی و خروجی قرار داده شدند. ماده‌ای به‌نام سودا لیم (Soda lime) (جاذب دی‌اکسید کربن) در زیر جعبه قرار داده شد تا دی‌اکسید کربن تولیدی را جذب کند. بدین ترتیب، امکان تغییر غلظت گاز داخل جعبه به حداقل رسید. اکسیژن خالص ورودی به جعبه (۰/۹۵) یا هوای اتاق در میزان ۳ لیتر در دقیقه برای تیمار جانوران به جعبه حاوی رت‌ها متصل شد. برای افزایش دقت آزمایش یک الکتروود سنجش اکسیژن نیز در کنار جعبه تعبیه شد تا غلظت اکسیژن داخل جعبه را اندازه‌گیری کند. آزمایش گازهای خون شریانی (Arterial Blood Gases: ABG) در هر دو آزمایش صورت گرفت.

۲-۳- ایجاد مدل سکته مغزی (MCAO)

رت‌ها بعد از توزین با داروی کلرات هیدرات (Merck)

نویسندگان حاضر طی پژوهش‌های قبل نشان داده‌اند که قرارگرفتن متناوب و پیوسته در معرض HO پدیده تحمل به ایسکمی را القاء می‌کند و باعث افزایش بیان نافلین گلوتامات، سطوح فاکتور نکروز تومور آلفا (Tumor Necrosis Factor-alpha: TNF- α) سرم، و آنزیم تبدیل‌کننده TNF- α (TNF- α Converting Enzyme: TACE) در مغز رت می‌شود [۲۰، ۲۱]. هیپرکسی نورومباریک متناوب (Intermittent HO: InHO) موجب کاهش ادم مغزی و افزایش استحکام BBB نیز می‌شود [۵].

هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین پدیده تحمل به ایسکمی حاصل از HO بر میزان فعالیت آنزیم SOD و کاهش آسیب حاصل از سکته مغزی در رت است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- گروه‌بندی حیوان آزمایشگاهی

رت‌های اسپیراگو-دالی (۲۵۰-۳۸۰ گرم) به‌طور تصادفی به چهار گروه حاوی ۲۰ حیوان تقسیم می‌شدند. دو گروه در درون جعبه اکسیژن با غلظت بالای ۹۰ درصد تحت عنوان شرایط هیپرکسی قرار داده شدند. از این دو گروه، یک گروه به‌صورت پیوسته (۲۴ ساعت، Prolonged HO: PrHO) و دیگری به‌صورت متناوب (۴ ساعت در روز) به‌مدت ۶ روز (InHO) در معرض اکسیژن بالای ۹۰ درصد (HO) قرار گرفتند. دو گروه دیگر وضعیت مشابه با دو گروه اول داشتند با این تفاوت که یک گروه به‌صورت پیوسته (۲۴ ساعت)، (Prolonged Room Air: PrRA) و دیگری به‌صورت متناوب (۴ ساعت در روز به‌مدت ۶ روز،

بود. برش‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه در محلول ۲ درصد ۲، ۳، ۵- تری فنیل تترازولیوم کلراید (Merck؛ 2, 3, 5- tri phenyl tetrazolum chloride، آلمان) نگهداری شدند. سپس با دوربین دیجیتال (نوکیا ۶۶۳۰) که قابل اتصال به کامپیوتر بود تصویربرداری شدند. بعد از انتقال تصاویر به کامپیوتر به واسطه نرم‌افزار Image Tools مساحت نواحی سفید و قرمز به ترتیب به عنوان نواحی آسیب‌دیده و سالم اندازه‌گیری شدند. حجم نواحی آسیب‌دیده و سالم برش‌ها از طریق محاسبه حاصل ضرب مساحت نواحی مذکور برش‌ها در ضخامت ۲ میلی‌متر برش به دست آمد و سپس به واسطه معادله زیر حجم اصلاح‌شده ناحیه آسیب‌دیده محاسبه شد [۳۱].

(حجم ناحیه آسیب‌دیده - حجم نیمکره راست) - حجم نیمکره چپ = حجم اصلاح‌شده ناحیه آسیب‌دیده

۲-۶- نمونه‌گیری مغزی و استخراج پروتئین

نمونه‌ها (۱۵۰ میلی‌گرم از بافت نیمکره راست) در یک میلی‌لیتر بافر [۰/۳۲ مول در لیتر ساکاروز، ۱ میلی‌مول در لیتر EDTA (Ethylene Dinitro Tetra acetic Acid)، و ۱۰ نانومول در لیتر تریس هیدروکلرید با $\text{pH} = 7.4$] با یکنواخت‌سازنده (Homogenizer) شیشه تفلون یکنواخت شدند. محلول یکنواخت شده بافت مغز با سرعت 13600 g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول رویی (Supernatant) جمع‌آوری و برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم SOD مورد استفاده قرار گرفت [۳۲]. غلظت پروتئین براساس روش برادفورد (Bradford) [۸] با استفاده از استاندارد آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin: BSA) اندازه‌گیری شد.

۲-۷- سنجش فعالیت آنزیم SOD

فعالیت کل SOD به واسطه روش جننت (Genet) و همکاری‌اش در سال ۲۰۰۲ [۷] با اندکی تغییر انجام شد. مخلوط سنجش نهایی در حجم کل نهایی ۱ میلی‌لیتر حاوی ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات سدیم، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA، ۰/۴۸

آلمان) (۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن) هوشبری شدند. جراحی مدل‌سازی MCAO مطابق دستورالعمل لونگا (Longa) و همکاری‌اش انجام شد [۳۰]. به‌طور خلاصه، تحت جراحی میکروسکوپی، یک نخ بخیه نایلون از طریق تنه ECA (External carotid artery) وارد رگ شد و تا رسیدن به ACA (Anterior cerebral artery) از میان ICA (Internal carotid artery) با پتریگوپالاتین (Pterygopalatine) بسته ادامه داده شد. در اثر تماس نخ بخیه و ACA جریان خون از هر طرف حلقه ویلیس (Willis) به MCA (Middle cerebral artery) بسته شد. این بسته شدن از طریق احساس مقاومت و در پیشروی نخ و ورود حدود ۲۰ میلی‌متر طول نخ از تنه ECA مشخص شد. بعد از ۶۰ دقیقه ایسکمی، برقراری مجدد جریان خون صورت گرفت. دمای بدن از طریق رکتوم (Rectum) اندازه‌گیری و میزان دما در حوالی ۳۷ درجه حفظ شد.

۲-۴- ارزیابی رفتاری حاصل از سکته

معاینه‌های نورولوژیک بعد از ۲۴ ساعت انجام شد. در طول ۲۴ ساعت بعد از شروع انسداد تا قربانی شدن حیوان مراقبت‌های ویژه انجام شد. یافته‌های نورولوژیکی در ۵ مقیاس دسته‌بندی می‌شوند: شماره صفر (۰) هیچ‌گونه عارضه نورولوژیک نشان ندادند؛ شماره یک (نارسایی کامل در انتهای پنجه‌های جلویی)، که یک نقص نورولوژیک کانونی خفیف در نظر گرفته شد؛ شماره دو (به چپ چرخیدن) نقص نورولوژیک کانونی متوسط؛ شماره ۳ (افتادن به سمت چپ) نقص کانونی شدید هستند؛ و رت‌های شماره ۴ به‌طور خود بخودی نمی‌توانستند راه بروند و سطح هوشیاری پایین داشتند [۴، ۳۰].

۲-۵- ارزیابی حجم سکته مغزی

بعد از قربانی کردن رت‌ها با کلرال هیدرات (۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن)، سر آن‌ها جدا شد و به سرعت مغزها خارج شدند و در سالین (Saline) ۴ درجه به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شدند. هشت برش به ضخامت ۲ میلی‌متر به صورت کرونال (Coronal) به واسطه دستگاه ماتریکس مغز تهیه شدند که شروع آن‌ها از پیاز بویایی

شریانی در شرایط هیپرکسی بسیار بالاتر از فشار اکسیژن شریانی در شرایط نورموکسی است.

جدول ۱ وضعیت ABG و تنفس در پایان تیمار با HO

میزان تنفس (هرتز)	PO2 (میلی متر جیوه)	PCO2 (میلی متر جیوه)	pH	گروه‌های آزمایشی
۱/۶۱±۰/۰۴	۹۲/۳±۱/۲۵	۴۱/۶±۰/۷۵	۷/۴±۰/۰۲	InRA
۱/۳±۰/۰۹	۳۶۰±۷/۴۵*	۳۹/۰±۱/۳	۷/۳±۰/۰۱	InHO
۱/۵۹±۰/۰۸	۹۳/۱±۰/۸۳	۴۰/۳±۰/۷۵	۷/۳۷±۰/۰۲	PrRA
۱/۲۹±۰/۰۴	۳۵۵±۵/۲*	۳۹/۳±۱/۳	۷/۳۵±۰/۰۲	PrHO

*:P<۰/۰۰۱

۲-۳- آثار PrHO و InHO بر NDS

میان NDS به واسطه قرارگیری در معرض HO به‌طور قابل ملاحظه کاهش می‌یابد. میان NDS در گروه‌های InHO و PrHO. InRA و PrRA در جدول ۲ نشان داده شده است. در رت‌هایی که به‌واسطه قرار گرفتن در معرض هیپرکسی هیچ‌گونه نقص نورولوژیک مشاهده نشده بود، با تزریق اوانس آبی (Blue Evance)، این رنگ در ناحیه مرکزی سگته مشاهده شد. این مدرک نشان می‌دهد که در کلیه رت‌های مذکور MCAO صورت گرفته است ولی به دلیل بروز پدیده تحمل به ایسکمی القایی هیپرکسی به‌ویژه در ناحیه پنومبرا (Penumbra) استحکام BBB افزایش یافته است.

جدول ۲ توزیع امتیازهای نورولوژیک در هر گروه و مقایسه آماری آنها. همان‌طوری که ملاحظه می‌کنید مقایسه گروه‌های ردیف InHO:InRA و PrHO:PrRA معنی‌دار است اما InHO:PrHO معنی‌دار نیست.

میان	تعداد کل	تعداد نقص‌های نورولوژیک در هر گروه					گروه‌های آزمایشی
		۰	۱	۲	۳	۴	
۲	۹	۰	۲	۴	۳	۰	InRA
۲	۹	۰	۱	۳	۵	۰	InHO
۲	۹	۰	۱	۴	۴	۰	PrRA
۱	۹	۰	۰	۱	۵	۳	PrHO

۳-۳- آثار PrHO و InHO بر حجم آسیب بافتی

نمودار ۱ نشان می‌دهد که PrHO و InHO در مقایسه با RA باعث کاهش حجم آسیب بافتی می‌شود. تفاوت آماری گروه‌های PrHO و InHO معنی‌دار نیست. تفاوت آماری گروه‌های مذکور نسبت به گروه S-RA معنی‌دار است. کاهش حجم آسیب بافتی و نقص‌های نورولوژیک اثر پدیده تحمل به ایسکمی حاصل از هیپرکسی را اثبات می‌کند.

میلی مولار پیروگالال (Pyrogallol)، و ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی است. تغییر جذب نوری در ۴۲۰ نانومتر مخلوط سنجش نهایی به مدت یک دقیقه در دمای ۲۵ درجه در مقایسه با محلول بلانک (Blank solution) که حاوی همه مواد غیر از بافت یکنواخت شده است اندازه‌گیری شد. یک واحد آنزیم طبق تعریف مقداری از آنزیم است که باعث مهار نصف حداکثر فعالیت اتواکسیداسیون پیروگالال می‌شود.

۲-۸- رنگ‌آمیزی فعالیت آنزیم SOD بر

روی ژل الکتروفورز پلی‌اکریل‌آمید (Polyacrylamide gel electrophoresis: PAGE)

PAGE در دمای ۴ درجه با ولتاژ ۱۲۰ ولت مطابق روش لاملی (Laemmli) در سال ۱۹۷۰ انجام شد [۳۳]. برای جداسازی الکتروفورزی SOD از ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۰ درصد استفاده شد. رنگ‌آمیزی از طریق روش بوکامپ (Beauchamp) و فریدوویچ (Fridovich) سال ۱۹۷۱ انجام شد [۲۷].

۲-۹- آنالیز آماری

سطح فعالیت آنزیم، حجم سگته مغزی و میزان ABG با استفاده از آزمون آنوای یک طرفه (one-way ANOVA) آنالیز شد. امتیازهای نقص نورولوژیک (Neurologic Deficit Score: NDS) با استفاده از آزمون من‌ویتنی U (Mann-Whitney U) تجزیه و تحلیل و داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف خطای معیار (Mean±SEM) نمایش داده شد. P<۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

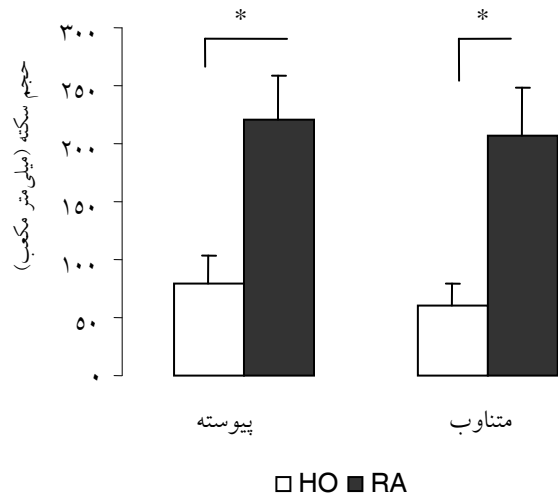
۳- نتایج

۳-۱- پارامترهای شرایط آزمایش

جدول ۱ محتوی اکسیژن داخل جعبه اکسیژن را در شرایط HO و نورموکسی نورموباریک (RA؛ هوای اتاق) نشان می‌دهد. براساس ارزیابی‌های آزمایش ABG فشار اکسیژن

۳-۴- آثار PrHO و InHO بر سطح فعالیت آنزیم SOD

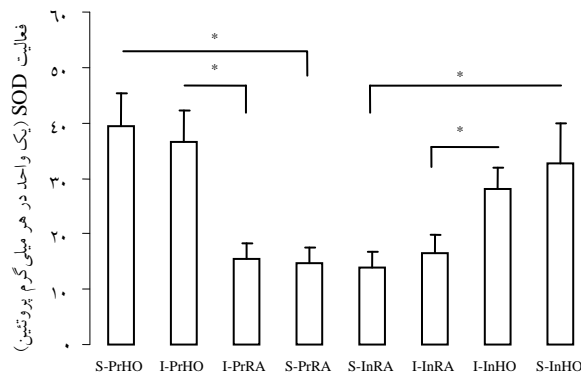
نمودار ۲ نشان می‌دهد که PrHO و InHO در مقایسه با RA باعث افزایش سطح فعالیت آنزیم SOD بعد از پایان پیش‌درمان هیپرکسی می‌شود. تفاوت آماری گروه‌های PrHO و InHO معنی‌دار نیست.



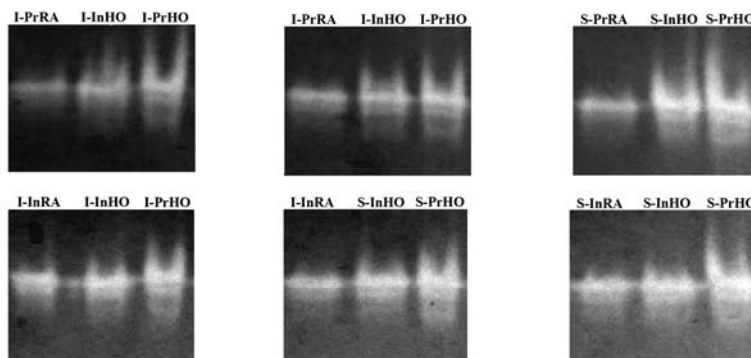
۳-۵- آثار PrHO و InHO بر روی ژل اکریل آمید آنزیم SOD

شکل ۱ نشان می‌دهد که PrHO و InHO در مقایسه با RA باعث افزایش سطح فعالیت آنزیم SOD بعد از پایان پیش‌درمان هیپرکسی می‌شود. این شکل یافته‌های نمودار ۲ را تأیید می‌کند.

نمودار ۱ اثر شرایط InHO, PrHO, InRA و PrRA را روی حجم آسیب بافتی ۴۸ ساعت بعد از پیش‌درمان نشان می‌دهد ($P < 0.05$).



نمودار ۲ فعالیت آنزیم SOD در گروه‌های مختلف آزمایش و کنترل ($P < 0.01$).



شکل ۱ رنگ‌آمیزی PAGE فعالیت آنزیم SOD در گروه‌های مختلف آزمایش و کنترل. در این شکل S-InHO, S-InRA, S-PrHO, S-PrRA به ترتیب نشانگر گروه‌های شم نورموکسی نورمواریک پیوسته، هیپرکسی نورمواریک پیوسته، نورموکسی نورمواریک متناوب و هیپرکسی نورمواریک متناوب و I-InHO, I-PrHO, I-PrRA, I-InRA به ترتیب نشانگر گروه‌های دست‌نخورده هیپرکسی نورمواریک متناوب، نورموکسی نورمواریک پیوسته، هیپرکسی نورمواریک پیوسته، نورموکسی نورمواریک متناوب هستند.

۴- بحث

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که PrHO و InHO می‌تواند NDS و حجم آسیب مغزی حاصل از سکته مغزی را به‌طور مؤثر در مدل MCAO کاهش می‌دهد. در حالی که اثر PrHO خفیف‌تر است (شکل ۱). از طرف دیگر نتایج آن با سایر مطالعات در زمینه تحمل به ایسکمی که در مقدمه اشاره شد مطابقت دارد [۷، ۲۱]. تحمل به ایسکمی در بافت‌های مغزی مورد آزمایش براساس مدت زمان و مقدار غلظت اکسیژن متفاوت بوده است. بنابراین، کمیت و کیفیت تجویز اکسیژن در القای تحمل به ایسکمی، عوارض جانبی و مسمومیت‌های آن روی بدن اهمیت دارد. نتایج پژوهش‌های قبلی نشان می‌دهد که هیپرکسی پیوسته در برخی موارد نارسایی‌های ریوی ایجاد می‌کند و دارای آثار جانبی و خواص سمی است [۳۵]. نتایج سایر محققین نشان می‌دهد که PrHO کمتر از ۲۴ ساعت آثار تحمل به ایسکمی را بروز نمی‌دهد [۲۱]. گزارش‌های دیگر نشان می‌دهد که قرار گرفتن در معرض اکسیژن ۹۵ درصد به مدت ۲۴ ساعت منجر به احتقان شدید ریوی می‌شود که در آن گلبول‌های قرمز خون، ادم و تغییر در ساختمان آلوئولی اتفاق می‌افتد. حتی بعد از ۲ هفته نیز بهبودی ساختمان آلوئولی کامل نمی‌شود [۳۵]. بنابراین، تجویز اکسیژن به‌صورت پیوسته منجر به اختلال عملکردی ریه‌ها می‌شود [۳۵]. تحقیقات دیگر نشان می‌دهد که پدیده حفاظت (Protection) قلبی در حیواناتی که در معرض هیپوکسی منقطع (اکسیژن‌رسانی مجدد و مکرر) قرار می‌گیرند در مقایسه با حیواناتی که هیپوکسی پیوسته را تجربه می‌کنند قوی‌تر بروز می‌کند [۲]. بنابراین با در نظر گرفتن نتایج حجم آسیب بافتی در این پژوهش و نتایج پژوهش‌های قبل هیپرکسی متناوب نسبت به هیپرکسی پیوسته سمیت کم و آثار تحمل به ایسکمی بیشتری القاء می‌کند.

اگرچه نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که هیپرکسی در مغز رت به‌واسطه کاهش حجم آسیب بافتی و NDS، حفاظت عصبی (Neuroprotection) را القاء می‌کند، اما هیپرکسی آثار دیگری نیز دارد که می‌تواند به‌واسطه آن‌ها

تحمل به ایسکمی را در مغز رت تقویت نماید. این آثار عبارتند از: ۱- مصرف مزمن هیپرکسی می‌تواند باعث رگ‌زایی و افزایش تراکم عروق در واحد حجم شود [۱۴]. ۲- هیپرکسی می‌تواند باعث بلوک شدن مولکول چسبان بین سلولی (Intercellular adhesion molecule-1: ICAM-1) و مهار تجمع نوتروفیل‌ها شود [۳۳، ۳۶]. بنابراین، هیپرکسی می‌تواند تجمع نوتروفیل‌ها را کاهش دهد و از آسیب مغزی بکاهد. دویر (Dewir) و همکارانش نشان دادند که رادیکال‌های آزاد اکسیژن و Bcl-2 که به‌عنوان مهارکننده مرگ برنامه‌ریزی شده سلول عمل می‌کند بعد از قرار گرفتن مکرر در معرض هیپرکسی افزایش می‌یابد و باعث افزایش توان زیستی نوروئی می‌شود [۱]. از طرف دیگر، افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و SOD با کاهش بیان فاکتور القایی هیپوکسی (Hypoxia induce factor-1 α : HIF- α) ارتباط دارد که گفته می‌شود عملکرد BBB را از طریق کاهش فاکتور رشد عروقی بهبود می‌بخشد [۸]. علاوه بر این، رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌تواند با افزایش TNF- α از طریق گیرنده TNF- α باعث بروز پدیده تحمل به ایسکمی شوند [۳۴]. از سوی دیگر، افزایش رادیکال‌های آزاد و SOD با کاهش BBB می‌شود که احتمالاً این عمل را از طریق کاهش فاکتور رشد عروقی انجام می‌دهد [۲، ۳۷].

سوپراکسید یکی از مواد تولیدی اساسی در استرس اکسیداتیو است. این ماده از منابع مختلف و در مراحل مختلف برقراری مجدد جریان خون به‌وجود می‌آید. سه آنزیم اصلی SOD وجود دارد. SOD مس و روی که اساساً در فضای بین دو غشای میتوکندری قطعات لیزوزومی و سیتوزولی یافت می‌شوند [۲۸، ۳۸]. SOD منگنز در ماتریکس میتوکندری یافت می‌شود. هم SOD مس و روی و هم SOD منگنز در بافت عصبی فراوان هستند و به همین دلیل بیشترین توجه محققین را به خود معطوف کرده‌اند. SOD خارج سلولی نیز در مغز یافت می‌شود اما غلظت آن نسبت به SOD منگنز و SOD مس و روی بسیار کم است [۲۸، ۳۹].

مطالعات نشان می‌دهد که ایسکمی‌های کوتاه مدت که منجر به ایجاد پدیده تحمل به ایسکمی می‌شوند،

با عنایت به توضیحات فوق، آنزیم SOD نقش غیرقابل انکاری در پدیده تحمل به ایسکمی دارد. از سوی دیگر InHO و PrHO می‌تواند باعث ایجاد پدیده تحمل به ایسکمی شود. بنابراین، همان‌گونه که در پژوهش‌های دیگر نشان داده شده است یکی از متغیرهای اصلی افزایش بیان و فعالیت SOD است، در پیش‌شرطی‌سازی با هیپرکسی نیز مطابق شکل ۱ و جدول ۲ که باعث ایجاد پدیده تحمل به ایسکمی می‌شود، این اثر خود را تا حدی به‌واسطه افزایش فعالیت آنزیم SOD به نمایش می‌گذارد (نمودار ۲ و شکل ۱).

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد: (۱) PrHO و InHO تحمل به ایسکمی را به‌وجود می‌آورند و باعث کاهش میزان نقص نورولوژیک و حجم آسیب بافتی می‌شوند. (۲) PrHO و InHO میزان فعالیت آنزیم SOD را افزایش می‌دهند. این اثر تا حدی می‌تواند تحمل به ایسکمی را وساطت کند. از طرف دیگر استفاده از روش InHO در مقایسه با PrHO به علت آثار سمی پایین برای القای پدیده تحمل به ایسکمی مناسب‌تر است. بنابراین، استفاده از HO یا طراحی موادی که قادر به تقلید از آثار HO در افزایش فعالیت آنزیم SOD باشند، روش و استراتژی جدیدی در پیدایش داروها به‌وجود 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.

۵- تشکر و قدردانی

این طرح پژوهشی مصوب دانشگاه شهید بهشتی است.

می‌توانند نیم ساعت بعد از استرس ایسکمی به‌طور قابل ملاحظه باعث افزایش بیان ژن CAT شوند. بنابراین، افزایش بیان ژن CAT تا حدی می‌تواند خصوصیات تحمل به ایسکمی را در بافت تأمین کند [۱۲، ۲۶]. همان‌طوری که قبلاً اشاره شد، عملکرد CAT به‌طور تنگاتنگ با عملکرد SOD مرتبط است. مطالعات دیگری نشان می‌دهد که فعال‌سازی آنزیم SOD به‌طور معنی‌دار می‌تواند از افزایش تخریب بافتی حاصل از ایسکمی جلوگیری کند [۲۶]. بنابراین، همان‌طوری که قبلاً نشان داده شده است عوامل هیپرکسی نیز می‌توانند فرایند تحمل به ایسکمی را در بافت مغز ایجاد کنند و حجم آسیب بافتی، ادم مغزی، و استحکام BBB را تا حد قابل ملاحظه‌ای بهبود بخشند [۵]. افزایش بیان SOD مس و روی آسیب ایسکمی حاصل از ایسکمی و برقراری مجدد جریان خون را کاهش می‌دهد [۱۹]. نشان داده شده است که افزایش بیان SOD مس و روی پروتئین کیناز فعال شده میتوزن (Mitogen-activated protein kinases) [۲۸، ۴۰]، مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده سلول [۲۸، ۳۱]، فعال‌سازی کسپاز میزان بیان HIF- α مرتبط است، این روند منجر به بهبود عملکرد Caspase [۱۸، ۲۸] و قطعه‌قطعه شدن DNA [۱۱، ۲۸] را مهار می‌کند. نتایج فوق نقش بی‌بدیل پروآپتوتیک (Pro-apoptotic) سوپراکسید در ایسکمی و برقراری مجدد جریان خون را نشان می‌دهد. این آسیب‌ها می‌تواند به‌واسطه افزایش بیان یا فعالیت آنزیم SOD از طریق پیش‌درمان با HO تخفیف یابد (نمودار ۲ و شکل ۱).

۶- منابع

- [1] Dewir YH, Chakrabarty D, Ali MB, Hahn EJ, Paek KY. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots. *Environ Exp Bot* 2006; 58; 93-9.
- [2] Kinouchi H, Epstein CJ, Mizui T, Carlson E, Chen SF, Chan PH. Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing CuZn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(24):11158-62.
- [3] Das DK, Moraru II, Maulik N, Engelman RM. Gene expression during myocardial adaptation

- to ischemia and reperfusion. *Ann NY Acad Sci* 1994; 723: 292-307.
- [4] Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 1986;17(6): 1304-8.
- [5] 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.
- [6] Lin CL, Chen HJ, Hou WC. Activity staining of glutathione peroxidase after electrophoresis on native and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 2002; 23(4): 513-6.
- [7] Genet S, Kale RK, Baquer NZ. Alterations in antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues: effect of vanadate and fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). *Mol Cell Biochem* 2002; 236(1-2): 7-12.
- [8] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
- [9] Helms AK, Whelan HT, Torbey MT. Hyperbaric oxygen therapy of cerebral ischemia. *Cerebrovasc Dis* 2005; 20: 417-26.
- [10] Chen SH, Cheung RT. Peripheral and central administration of neuropeptide Y in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model reduces cerebral blood flow and increases infarct volume. *Brain Res* 2002; 927(2): 138-43.
- [11] Valen G. Cellular signalling mechanisms in adaptation to ischemia-induced myocardial damage. *Ann Med* 2003; 35(5): 300-7
- [12] Currie RW, Tanguay RM. Analysis of RNA for transcripts for catalase and SP71 in rat hearts after in vivo hyperthermia. *Biochem Cell Biol* 1991; 69(5-6): 375-82.
- [13] Gidday JM, Fitzgibbons JC, Shah AR, Park TS. Neuroprotection from ischemic brain injury by hypoxic preconditioning in the neonatal rat. *Neurosci Lett* 1994; 168(1-2): 221-4.
- [14] 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(1): 21-4.
- [15] Riepe MW, Esclaire F, Kasischke K, Schreiber S, Nakase H, Kempfski 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(3): 257-64.
- [16] 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(2): 246-52.
- [17] 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-kappaB. *J Neurochem* 2001; 78(4): 909-19.
- [18] Toyoda T, Kassell NF, Lee KS. Induction of

- ischemic tolerance and antioxidant activity by brief focal ischemia. *Neuroreport* 1997; 8(4): 847-51.
- [19] 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(1): 95-9.
- [20] Bigdeli MR, Hajizadeh S, Frouzandeh M, Heidarianpour A, Rasoulilian B, Asgari AR, Pourkhalili K, Khoshbaten A. Normobaric hyperoxia induces ischemic tolerance and upregulation of glutamate transporters in the rat brain and serum TNF-alpha level. *Exp Neurol* 2008; 212(2): 298-306.
- [21] Bigdeli MR, Khoshbaten A. In vivo preconditioning with normobaric hyperoxia induces ischemic tolerance partly by triggering tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/tumor necrosis factor-alpha/nuclear factor-kappa B. *Neuroscience* 2008; 153: 671-8.
- [22] Orrenius S, McCabe MJ Jr, Nicotera P. Ca(2+)-dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death. *Toxicol Lett* 1992; 64-65: 357-64.
- [23] Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 1995; 15(4): 961-73.
- [24] Linnik MD, Zobrist RH, Hatfield MD. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1993; 24(12): 2002-8.
- [25] Oh DJ, Kim YH, Kim CH, Park JW, Kim MS. Pretreatment of hyperbaric oxygenation increases the activation of myocardial antioxidant enzymes and protect the ischemia reperfusion injury of the heart. *Korean J Physiol Pharmacol* 1997; 1: 749-58.
- [26] Kim YH, Chun YS, Park JW, Kim CH, Kim MS. Involvement of adrenergic pathways in activation of catalase by myocardial ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 282: R1450-8.
- [27] Fridovich I. Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 1986; 247(1):1-11.
- [28] Warner DS, Sheng H, and Batinic-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol* 2004; 207(Pt 18): 3221-31.
- [29] Namba K, Takeda Y, Sunami K, Hirakawa M. Temporal profiles of the levels of endogenous antioxidants after four-vessel occlusion in rats. *J Neurosurg Anesthesiol* 2001; 13(2): 131-7.
- [30] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; 20(1): 84-91.
- [31] Mattson MP, Culmsee C, Yu Z, Camandola S. Roles of nuclear factor kappaB in neuronal survival and plasticity. *J Neurochem* 2000; 74(2): 443-56.
- [32] Xia E, Rao G, Van Remmen H, Heydari AR, Richardson A. Activities of antioxidant enzymes in various tissues of male Fischer 344 rats are altered by food restriction. *J Nutr* 1995; 125(2): 195-201.
- [33] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

- bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259): 680-5.
- [34] Lin CL, Chen HJ, Hou WC. Activity staining of glutathione peroxidase after electrophoresis on native and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 2002; 23(4): 513-6.
- [35] Al-Motabagani MA. Histological changes in the alveolar structure of the rat lung after exposure to hyperoxia. *Ital J Anat Embryol* 2005; 110(4): 209-23.
- [36] Leong KG, Karsan A. Signaling pathways mediated by tumor necrosis factor alpha. *Histol Histopathol* 2000; 15(4): 1303-25.
- [37] Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Narasimhan P, Copin JC, Kawase M, Chan PH. Copper-zinc superoxide dismutase prevents the early decrease of apurinic/aprimidinic endonuclease and subsequent DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 1999; 30(11): 2408-15.
- [38] Romero FJ, Romá J, Bosch-Morell F, Romero B, Segura-Aguilar J, Llombart-Bosch A, Ernster L. Reduction of brain antioxidant defense upon treatment with butylated hydroxyanisole (BHA) and Sudan III in Syrian golden hamster. *Neurochem Res* 2000; 25(3): 389-93.
- [39] Saito A, Hayashi T, Okuno S, Ferrand-Drake M, Chan PH. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic mice protects against neuronal cell death after transient focal ischemia by blocking activation of the Bad cell death signaling pathway. *J Neurosci* 2003; 23(5): 1710-8.
- [40] Sugawara T, Noshita N, Lewén A, Gasche Y, Ferrand-Drake M, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Chan PH. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation. *J Neurosci* 2002; 22(1): 209-17.