

مقاله پژوهشی

بررسی میزان بیان $HIF1\alpha$ در پدیده تحمل به ایسکمی القاء شده به واسطه هیپراکسی نورموباریک متناوب در مدل سکتة مغزی موش صحرایی

فیروزه علویان^۱، سهراب حاجی زاده^۲، محمد جوان^۳، محمدرضا بیگدلی^۴

^۱ دانشجوی دکتری فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۲ استاد گروه فیزیولوژی، پژوهشکده علوم شناختی تهران، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۳ دانشیار گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۴ استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

نشانی نویسنده مسؤول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی، دکتر سهراب حاجی زاده

E-mail: hajizads@modares.ac.ir

وصول: ۹۰/۱۱/۲۶، اصلاح: ۹۱/۱/۲۶، پذیرش: ۹۱/۲/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: اخیراً نشان داده شده هیپراکسی نورموباریک اثر درمانی قابل ملاحظه‌ای در درمان ایسکمی حاد دارد که اصطلاحاً پیش شرطی سازی نامیده می‌شود. به هر حال به خوبی مشخص نیست این پیش شرطی در محیط زنده چگونه عمل می‌کند. در مطالعه حاضر اثر هیپراکسی نورموباریک متناوب بر بیان $HIF1\alpha$ در مدل سکتة مغزی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: مطالعه از نوع تجربی بوده و حیوانات شامل ۴ گروه، هر گروه شامل ۶ موش صحرایی بودند. غلظت اکسیژن استنشاقی اعمال شده در گروه‌های هیپراکسی ۹۵ درصد روزانه ۴ ساعت و به مدت ۶ روز متوالی و در گروه کنترل با همان شرایط با غلظت اکسیژن ۲۱ درصد (نورموکسی) بود. ۲۴ ساعت بعد موش‌های صحرایی گروه سکتة به مدت ۶۰ دقیقه تحت انسداد شریان کاروتید راست قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت از جریان خون مجدد، اسکور نقایص نورولوژیک مورد مقایسه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که در گروه سکتة نسبت به نورموکسی میزان پروتئین $HIF1\alpha$ افزایش می‌یافت؛ در حالی که در گروه هیپراکسی نسبت به نورموکسی میزان این پروتئین تفاوت معناداری نداشت. در گروه هیپراکسی سکتة افزایش معناداری در میزان $HIF1\alpha$ مشاهده شد. همچنین هیپراکسی امتیاز نقایص نورولوژی را از ۸/۸۳ درصد به ۳/۴۶ درصد کاهش داد.

نتیجه‌گیری: هیپراکسی به واسطه هیدروکسیلاسیون $HIF1\alpha$ موجب ناپایداری آن می‌شود. در گروه سکتة با نرسیدن اکسیژن به سلول‌ها، از هیدروکسیله شدن و تخریب $HIF1\alpha$ جلوگیری می‌گردد. در گروه هیپراکسی سکتة، سیتوکین‌های التهابی با همکاری گونه‌های آزاد اکسیژن باعث القای افزایش بیان $HIF1\alpha$ می‌شوند. (مجله دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۱۹/ شماره ۳/ صص ۲۹۵-۲۸۷).

واژه‌های کلیدی: هیپراکسی، سکتة، پیش شرطی سازی، موش صحرایی، $HIF1\alpha$

مقدمه

در دنیاست (۱). پیش شرطی سازی ایسکمیک پدیده‌ای

درون زاد است که مسئول افزایش تحمل بافت مغزی در

ایسکمی مغزی یکی از شایع‌ترین علل مرگ و میر

برابر آسیب‌های بعد از سکته مغزی است (۲). بدین معنی که اعمال دوره‌های کوتاه ایسکمی و جریان مجدد قبل از القای یک دوره ایسکمی طولانی مدت، سبب کاهش عوارض ناشی از ایسکمی و جریان مجدد بعدی می‌شود. پیش شرطی سازی به ایسکمی ممکن است اجزای عصبی، میوکاردی و عروقی را درگیر سازد که فرآیندهای متعدد سلولی را جامعیت می‌دهد تا در نهایت منجر به کاهش مصرف انرژی و آسیب ناشی از خون رسانی مجدد شود. از زمان ابداع این روش تاکنون پیش شرط سازهای مختلفی شناخته شده است مانند: رسپتور-N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) (۳)، آنوکسی (۴)، القاء پروتیین‌های شوک حرارتی (۵)، مهار فسفوریلاسیون اکسیداتیو (۶) و استرس اکسیداتیو (۷). یکی از روش‌های جدید برای افزایش مقاومت بافت‌ها در برابر ایسکمی استفاده از روش هیپرکسی نورموباریک می‌باشد. این روش آثار سمی و جانبی روش‌های قبلی را ندارد و قابلیت پیاده سازی بالینی را دارد (۸،۹). روشن شدن پاسخ این سؤال که هیپرکسی نورموباریک چگونه و با چه مکانیسم‌هایی قادر به ایجاد تحمل به ایسکمی است، می‌تواند منشأ اطلاعات فیزیولوژیکی و کاربردی مفیدی باشد.

Hypoxia Induce Factors (HIFs) فاکتورهای رونویسی هستند که در پاسخ به تغییرات اکسیژن، مخصوصاً در پاسخ به کاهش اکسیژن تولید می‌شوند (۱۰). HIF1 α هترودیمیتری شامل دو زیرواحد α و β می‌باشد و متعلق به خانواده Basic-helix-helix است. زیرواحد α هدف هیدروکسیلاسیون به وسیله HIF1 α prolyl-hydroxylase است که موجب نشانه‌گذاری HIF1 α برای E3 ubiquitin ligase می‌شود و نتیجه آن، تجزیه سریع HIF به وسیله پروتئوزوم است. این وضعیت در زمانی که اکسیژن نورموکسی باشد رخ می‌دهد. در وضعیت هیپوکسی هیدروکسیلاز مهار شده و HIF پایدار است. هیپوکسی هم‌چنین منجر به تجمع سوکسینات به واسطه مهار زنجیره انتقال میتوکندری می‌شود و

سوکسینات باعث مهار فعالیت هیدروکسیلاز است (۱۱). روند آبشاری سیگنال HIF منجر به تعدیل اثرات هیپوکسی است. وقتی HIF-1 α به واسطه هیپوکسی پایدار می‌شود به HIF-responsive elements α ژن‌های هدف خود وصل شده و باعث رونویسی چندین ژن می‌شود که تضمین‌کننده حیات سلول ضمن هیپوکسی هستند، مانند آنزیم‌های گلیکولیز که اجازه تولید ATP در یک روش غیر وابسته به اکسیژن را می‌دهند و ژن VEGF که خود باعث آنژیوژنز است (۱۱،۱۲).

اخیراً نشان داده شده پیش شرطی سازی با هیپرآکسی هیپرباریک (HBO-PC) در جلوگیری از آسیب‌های هیپوکسی در بسیاری از مدل‌های حیوانی اثربخش است. HBO-PC باعث افزایش محتوای HIF-1 α در کورتکس مغز است و از تغییرات نفوذپذیری سد خونی-مغزی و ادم مغزی ایجاد شده در شرایط هیپرآکسی جلوگیری می‌کند (۱۳).

در تحقیقی دیگر با روش رتینوپاتی القا شده با هیپرآکسی بر روی موش‌ها، سطوح HIF-1 α در رتینال افزایش یافت (۱۴).

تا کنون تأثیر هیپرآکسی نورموباریک بر بیان HIF-1 α در مدل ایسکمی بررسی نشده است. لذا این موضوع که در تحقیق حاضر مورد بررسی قرار گرفت و ضمن مطالعه امتیاز نقایص نورولوژی ثبت و بررسی شد.

مواد و روش‌ها

حیوانات و شرایط آزمایشگاهی: این مطالعه از نوع تجربی بوده و از موش‌های نر نژاد ویستار (۲۵۰ تا ۳۵۰ گرم) استفاده شد. نمونه‌گیری و گروه‌بندی به‌طور تصادفی صورت گرفت. موش‌های صحرایی با سیکل روشنایی - تاریکی ۱۲ ساعته، دمای حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. کلیه اصول اخلاقی مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت.

محل انجام آزمایش‌ها در دانشگاه تربیت مدرس تهران انجام گرفت.

ایجاد مدل سکنه مغزی MCAO: موش‌های وزن شده وبا کلرات هیدرات (Merck, Germany) (400mg/kg) و داخل صفاقی بیهوش می‌شدند. سپس به کمک میکروسکوپ جراحی شاخه راست کاروتید و شاخه اکسترنال آن نمایان شده و با دقت از عصب واگ و بافت‌های مجاور جدا شده، پایه کاروتید راست و شاخه اکسترنال را با نخ بخیه محکم بسته، شاخه اینترنال و سرخرگ پتریگوپالاتین با کلیپ بسیار ظریف، موقت مسدود شده سوراخ کوچکی در کاروتید راست ایجاد نموده و نخ نایلون ۳-۰ را با دقت حدود ۲۲-۲۰ میلی‌متر از آن عبور داده تا حدی که سر نخ نایلونی ابتدای سرخرگ سری جلویی را لمس کند؛ به عبارتی زمانی که مقاومت ملایم حس شود. در طول جراحی درجه حرارت رکتال کنترل می‌شد (Citizen-513w) و حدود ۳۷ درجه سانتی‌گراد به وسیله گرم‌کردن و یا خنک‌کردن سطحی ثابت می‌ماند.

ریت تنفسی - قلبی و غلظت گازها در محدوده فیزیولوژیک کنترل می‌شد. جریان خون مغز نیز پیوسته با دستگاه لیزر داپلر (LDF; Moor Instrument, UK) برای اطمینان از ایجاد مدل سکنه (در ایجاد ایسکمی موفق بیش از ۸۰ درصد کاهش جریان خون لازم است (۸,۱۵)) استفاده شد. جریان خون مجدد با خارج کردن نخ نایلونی بعد از ۱ ساعت برقرار می‌شد. گروه‌های شم در همان شرایط گروه سکنه، به جز عدم عبور نخ نایلونی تیمار شدند.

نورموباریک نورموکسی و نورموباریک

هیپراکسی: حیوانات شامل ۴ گروه، هر یک شامل ۶ موش صحرائی نژاد ویستار بودند: گروه شم، گروه شم هیپراکسی، گروه سکنه و گروه هیپراکسی سکنه. مدل هیپراکسی در جعبه‌ای به ابعاد ۲۵۰×۳۵۰×۶۵۰mm و با غلظت ۹۵ درصد اکسیژن (به مدت ۶ روز پیوسته، هر روز

۴ ساعت) ایجاد شد، غلظت اکسیژن به وسیله حس‌گر حساس به اکسیژن (Lutron-Do5510 oxygen sensor, Taiwan مداوم کنترل می‌شد. سودالیم (BDH Limited, Poole, England) که نوعی جاذب CO2 است در گوشه-های جعبه قرار می‌گرفت. گروه‌های نورموکسی به همین شکل در جعبه قرار می‌گرفتند با این تفاوت که در معرض اکسیژن ۲۱ درصد قرار داشتند.

ارزیابی رفتاری نقایص نورولوژیک: معاینه‌های

نورولوژیک ۲۴ ساعت پس از ایسکمی - جریان مجدد انجام می‌شد. در طول ۲۴ ساعت بعد از شروع انسداد تا قربانی شدن حیوان مراقبت‌های ویژه انجام می‌گرفت. یافته‌های نورولوژیک در ۵ مقیاس دسته‌بندی می‌شوند (۱۵). شماره صفر: هیچ‌گونه عارضه نورولوژیک نشان نمی‌دهد؛ شماره یک: (نارسایی کامل در انتهای پنجه‌های جلویی)، نقص نورولوژیک کانونی خفیف؛ شماره دو: (به چپ چرخیدن) نقص نورولوژیک کانونی متوسط؛ شماره ۳: (افتادن سمت چپ) نقص کانونی شدید؛ ۴: موش‌های صحرائی به‌طور خود به‌خودی نمی‌توانند راه بروند و سطح هوشیاری پایینی دارند و شماره ۵: موش‌های صحرائی که طی ۲۴ ساعت بعد از جراحی می‌میرند در صورتی که بعد از رنگ‌آمیزی بخش وسیعی از مغزشان آسیب‌دیده باشد و مرگ منحصر به سکنه مغزی باشد، در این گروه قرار می‌گیرد.

بررسی سطح پروتئین توسط تکنیک وسترن

بلا: در این مطالعه میزان بیان پروتئین HIF1 α با تکنیک وسترن بلا مورد سنجش قرار گرفت. ابتدا نمونه بافت مغز از فریزر خارج و توسط بافر لیزکننده حاوی آنتی پروتئاز هموژنیزه گردید. بافت هموژن شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۲۰۰rpm برای مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول بالای را جدا کرده و در داخل لوله اپندورف در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد گردید. جهت انجام وسترن بلا ابتدا غلظت پروتئین به روش برادفورد سنجیده می‌شود. پس از آماده

نورموباریک (۲۱ درصد) و هیپراکسی نورموباریک (۹۵ درصد) نشان می‌دهد. براساس ارزیابی‌های آزمایش گازهای خونی شریانی، فشار اکسیژن شریانی بسیار بالاتر از فشار اکسیژن شریانی در شرایط نورموکسی است (P<۰/۰۰۰۱*** (جدول ۱).

بررسی تغییرات جریان خون شریان مرکزی:

برای اطمینان از ایجاد مدل سخته لازم است که جریان خون مغز به کم‌تر از ۸۰ درصد از خط پایه ولی نه تا حد صفر، کاهش یابد. از شروع جراحی تا بسته‌شدن رگ مدت زمانی طول می‌کشد. در واقع زمان صفر، زمان شروع سخته می‌باشد. هم‌چنین پس از جریان مجدد مدتی طول می‌کشد تا جریان خون دوباره افزایش یابد و البته به اندازه جریان خون اولیه نمی‌باشد (نمودار ۲).

بررسی تغییرات میانگین امتیازهای نقص نورولوژیک:

میانگین امتیازهای نقص نورولوژیک به واسطه انسداد گذرای شریان مرکزی در گروه‌های هیپراکسی به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت (جدول ۲).

اثر هیپراکسی نورموباریک بر بیان پروتئین HIF1 α :

مقایسه میانگین میزان بیان HIF1 α در سطح پروتئین (نمودار ۳) با آزمون واریانس دو طرفه نشان می‌دهد که در ناحیه کرتکس (نمودار ۳ الف)، گروه‌های سخته نسبت به شم به‌طور معناداری سطوح بالاتری از HIF1 α را بیان می‌کنند (Fstroke vs sham=33.01, P<0.001). سطح پروتئین گروه هیپراکسی در مقایسه با گروه نورموکسی افزایش معناداری را نشان داد (FHO vs

سازی ژل SDS-PAGE، غلظت مناسبی از پروتئین هر نمونه بر روی ژل الکتروفورز می‌شود. سپس باندهای موجود بر روی کاغذ PVDF منتقل می‌شود. غشاءها در محلول ۵ درصد شیر خشک بدون چربی و BSA ۱ درصد برای مدت یک ساعت بلاک شدند. HIF1 α با آنتی بادی اولیه (Santa Cruz Biotechnology) polyclonal antibody (HIF1 α (H-206) Cruz Biotechnology) و آنتی بادی ثانویه Horseradish peroxidase-۷۵۰ و آنتی بادی ثانویه (Santa Cruz conjugated Donkey anti-Goat Biotechnology) با رقت ۱ به ۱۰۰۰۰ مورد شناسایی قرار گرفتند. در مرحله آخر، بلات با ماده ظهور کمولومینسانس آغشته می‌شود و در تاریک خانه در مجاورت فیلم عکاسی قرار می‌گیرد تا محل ظهور کمپلکس پروتئین-آنتی بادی بر روی فیلم ظاهر شود (۱۶).

آنالیز آماری: پارامترهای فیزیولوژیکی با استفاده

از آزمون آنوای دو طرفه و بن فرونی تست مورد آنالیز قرار گرفت. امتیازهای نقص نورولوژیک با استفاده از آزمون Fisher exact مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تمام آنالیزها با کمک نرم‌افزار Graph Pad Prism نسخه ۵ و رسم اشکال با استفاده از نرم افزار Excel انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار نمایش داده شد. P<۰/۰۰۵ از لحاظ آماری معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

پارامترهای شرایط تجربی: نمودار (۱) محتوای اکسیژن (%/ داخل جعبه اکسیژن را در شرایط نورموکسی

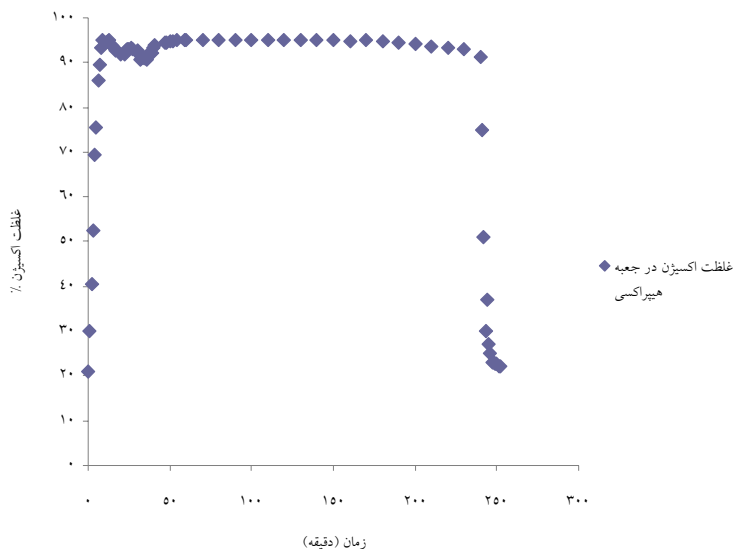
جدول ۱: پارامترهای فیزیولوژیکی در گروه‌های آزمایشی سخته. (P<۰/۰۰۰۱***، هیپراکسی در مقایسه با نورموکسی

گروه‌ها	pH	فشار O ₂ (میلی متر جیوه)	فشار CO ₂ (میلی متر جیوه)	سرعت ضربان قلب (هرتز)	فشار خون (میلی متر جیوه)	سرعت تنفسی (هرتز)
سخته + نورموکسی	۷/۴ \pm ۰/۰۱۵	۹۲/۸ \pm ۱/۶۵	۴۱/۱۶ \pm ۰/۷	۳۵۹/۹۷ \pm ۲۸/۴۴	۸۴/۴۴ \pm ۲۶/۳	۱/۶۵ \pm ۰/۴۵
سخته + هیپراکسی	۷/۳ \pm ۰/۰۱	۳۵۲/۱ \pm ۸/۸***	۳۹/۲ \pm ۰/۹۵	۳۶۳ \pm ۱۲/۰۱	۸۳/۱۳ \pm ۲۲/۳	۱/۳۷ \pm ۰/۶

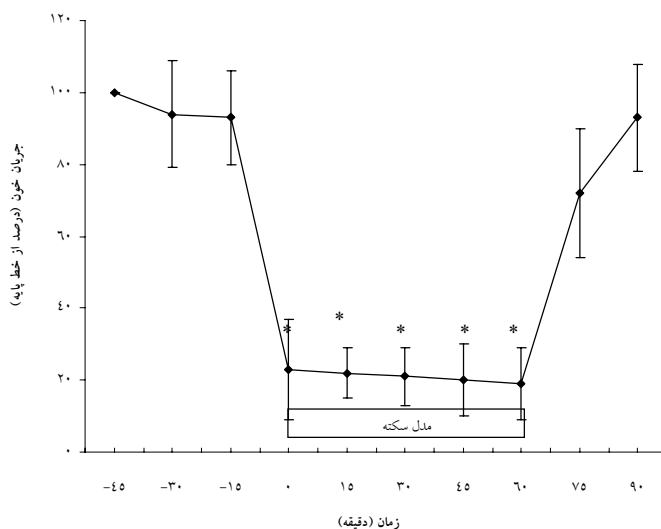
آنالیز گازهای خونی - شریانی، وجود کلینیکی هیپراکسی در گروه‌های مورد نظر را ثابت می‌کند.

جدول ۲: توزیع اسکورهای نورولوژیک در هر گروه و مقایسه آماری آنها

ردیف	گروه‌ها	تعداد نقص‌های نورولوژیک هر گروه	تعداد کل	میان	نتایج آماری (ارزش P)
۱	سخته	۰	۱	۲	P<۰/۰۰۵
۲	سخته + هیپراکسی	۱۰	۸	۲۴	
۳	کل	۲۰	۱۲	۴۸	



نمودار ۱: تغییرات غلظت اکسیژن در واحد زمان



نمودار ۲: تغییرات جریان خون مغزی قبل، حین و بعد از ایسکمی

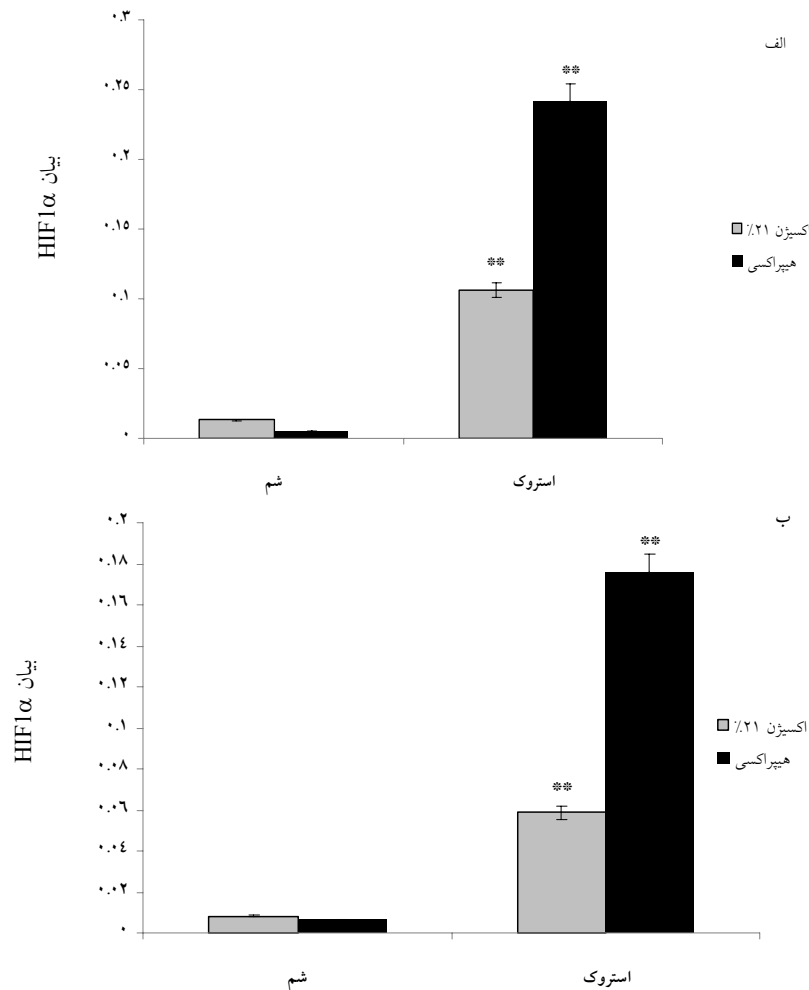
امتیاز نقص‌های نورولوژیک و میزان بیان $HIF1\alpha$ بررسی شد. در مدل MCAO، میانگین امتیاز نقص نورولوژیک، با به کار بردن هیپراکسی، به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت و میزان بیان $HIF1\alpha$ در گروه‌های نورموکسی تفاوتی معنادار با گروه‌های هیپراکسی نداشت.

پیشنهاد شده که قرارگیری قبلی در معرض استرس غیر آسیب‌رسان می‌تواند باعث حفاظت بعدی در برابر استرس شدیدتر شود. این پدیده تحت عنوان تحمل متقابل شناخته شده است که اثر آن به انواع متنوعی از ارگان‌ها و انواع استرس‌ها قابل تعمیم است (۲، ۱۷). به هر حال تغییرات قابل توجهی در رونویسی ژن با ترجمه و

هم‌چنین تداخل بین گروه‌ها نیز معنادار بود ($F_{interaction}=6.285, P<0.05$). در نواحی مرکزی مغز (نمودار ۳ ب) مشابه با کرتکس، سکته منجر به افزایش معنادار بیان پروتئین $HIF1\alpha$ در مقایسه با گروه شام شد ($F_{Stroke vs Sham}=24.24, P<0.001$). در این ناحیه هیپراکسی سبب افزایش معنادار بیان این پروتئین در مقایسه با نورموکسی شد ($P<0.05, F_{FHO vs RA}=6.668$). هم‌چنین تداخل بین گروه‌های هیپراکسی و نورموکسی با شام و سکته معنادار بود ($F_{interaction}=7.144, P<0.05$).

بحث

در این مطالعه تأثیر هیپراکسی نورموباریک بر



نمودار ۳: اثر هیپراکسی بر بیان HIF1 α در کورتکس (الف) و مرکز (ب) را نشان می‌دهد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار نمایش داده شده‌اند. ** $P < 0.01$ نسبت به گروه شام سنجیده شده است.

نقش مهمی دارد. علاوه بر هیپوکسی، محرک‌های دیگری چون فاکتورهای رشد، سیتوکین‌ها، هورمون‌های عروقی و پروتئین‌های ویروسی می‌توانند باعث القای HIF1 α شوند (۲۰). بر اساس نتایج به دست آمده از این مطالعه میزان بیان پروتئین HIF1 α در گروه‌های هیپراکسی افزایش معناداری را نسبت به گروه کنترل نشان داد. علاوه بر این تداخل میان هیپراکسی و سکته در افزایش بیان HIF1 α معنادار می‌باشد. این نتیجه در راستای نتایج قبلی به دست آمده در شرایط هیپراکسی در نقاط دیگر بدن است (۱۴، ۱۳).

اما این نتایج غیر معمول به نظر می‌رسد؛ چرا که زمانی که اکسیژن در محیط حضور داشته باشد، با افزایش اکسیژن در فضای بین سلولی و فعالیت آنزیم

با انواع متنوعی فعالیت که ممکن است در تحمل بافت مغز در برابر ایسکمی مؤثر باشند به دنبال ایسکمی ناحیه-ای گزارش شده است.

در مطالعه حاضر تأیید شد که پیش شرطی‌سازی با هیپراکسی نورموباریک متناوب می‌تواند باعث کاهش امتیاز نقص نورولوژیکی حاصل از سکته مغزی در مدل MCAO شود. مدل MCAO به واسطه نخ بخیه ایجاد می‌شود که مدلی مطمئن و قابل تکرار در مدل‌های سکته مغزی حیوانی است (۱۸). این یافته‌ها موافق با آزمایش‌های انجام شده قبلی مدل MCAO می‌باشد (۱۹).

HIF1 α یک فاکتور رونویسی است که به نظر می‌رسد در تنظیم تحمل به ایسکمی القا شده به واسطه هیپوکسی حیاتی باشد، هم‌چنان که در سازش گرمایی

همودایمریزاسیون و اتوفسفوریلاسیون JAK-2، مسیره‌های فسفوریلاسیون پایین دست مانند MAPKها را فعال کرده که به دنبال آن حفاظت مغزی رخ می‌دهد (۲۱). بنابراین با به کارگیری هیپراکسی در زمان سکته و افزایش HIF1 α ، مکانیسم حفاظتی مناسبی فعال می‌شود. هم‌چنین اثر هیپراکسی در کاهش امتیاز نقص‌های نورولوژیک می‌تواند تا حدی تحمل به ایسکمی را وساطت کند و اهمیت هیپراکسی در بهبود عملکرد رفتاری را تأیید می‌کند (۲۲).

هیپراکسی در زمان سکته باعث کاهش میزان نقص نورولوژیک و پایداری HIF1 α می‌شود. این آثار تا حدی می‌تواند تحمل به ایسکمی را وساطت کند. به منظور بررسی مکانیسم دقیق و این‌که چگونه به کارگیری هم‌زمان هیپراکسی و سکته منجر به افزایش بیان HIF1 α می‌شود، مطالعات بیشتری لازم است.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. از مشاوره علمی و مؤثر دکتر مانی و همکاری خانم‌ها فاطمه محقق و اعظم عسگری نیز تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از آقای دکتر حسن برای تهیه داروی PMSF تقدیر می‌گردد.

هیدروکسیلاز، HIF1 α هیدروکسیله شده و به دنبال هیدروکسیله شدن، این پروتئین یوبی گوتینه می‌شود، و این مارکر یوبی گوتین باعث هدایت HIF1 α به سمت پروتئوزوم‌ها می‌شود که به دنبال آن در این محل تخریب می‌شوند (۱۱). بنابراین، انتظار داریم در گروه هیپراکسی که میزان اکسیژن نسبت به گروه نورموکسی بسیار بالاتر است مقادیر HIF1 α کاهش یابد؛ اما در کارهای قبلی و در کار ما در زمان هیپراکسی میزان HIF1 α افزایش معنادار داشت (۱۳، ۱۴). البته هنوز علت این مسأله مشخص نیست. به نظر می‌رسد هیپراکسی در این مدل با به کارگیری برخی مسیره‌های داخل سلولی و فعال شدن برخی فاکتورهای رونویسی منجر به افزایش HIF1 α شده باشد. هم‌چنین به نظر می‌رسد گونه‌های آزاد اکسیژن در گروه‌های هیپراکسی - سکته، در تنظیم HIF1 α نقش مهمی داشته باشند؛ به طوری‌که گونه‌های آزاد اکسیژن با به کارگیری سیتوکین‌های التهابی حاصل از سکته موجب پایداری HIF1 α می‌شوند. علاوه بر این احتمال افزایش میزان بیان این پروتئین نیز وجود دارد. افزایش این فاکتور در گروه‌های هیپراکسی - سکته می‌تواند عامل حفاظتی مؤثری در برابر سکته باشد، زیرا HIF1 α باعث افزایش نسخه‌برداری از ژن‌هایی نظیر VEGF و EPO شده، VEGF در رگزایی نقش داشته و تراکم عروق در واحد حجم افزایش می‌یابد. EPO نیز از طریق القای

References

- Murray C, Lopez A. Mortality by cause for eight regions of the world Global Burden of Disease Study Lancet. 1997; 349:1269-76
- Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, et al. Ischemic tolerance phenomenon found in the brain. Brain Res. 1990; 528(1):21-4.
- Kato H, Liu Y, Araki T, Kogure K. but not anisomycin, inhibits the induction of tolerance to ischemia in the gerbil hippocampus. Neurosci Lett. 1992; 139:118-21.
- Perez-Pinzon MA, Mumford PL, Rosenthal M, Sick TJ. Anoxic preconditioning in hippocampal slices: role of adenosine. Neuroscience. 1996; 75:687-94.
- Kirino T. Ischemic tolerance. Cereb Blood Flow Metab. 2002; 22:1283-96
- Chen J, Simon R. Ischemic tolerance in the brain. Neurology. 1997; 48:306-11.
- Ohtsuki T, Matsumoto M, Kuwabara K, Kitagawa K, Suzuki K, Taniguchi N, et al. Influence of oxidative stress on induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. Brain Res. 1992; 599:246-52.

8. Bigdeli MR, Hajizadeha S, Froozandeh M, Rasulianc 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.
9. Pardillo J, Huertado O, Romera C, Cardenas A, Fernandez P, Alonso-Escolano D, et al. TNF-R1 mediates increased neuronal membrane EAAT3 expression after in vivo cerebral ischemic preconditioning. *Neurosci Lett.* 2006;138:1171-8.
10. Rotem k, Yuval D, Eli K, Oded M, Alexander L. Activated pp60c-Src Leads to Elevated Hypoxia-inducible Factor (HIF)-1 α Expression under Normoxia. 2002; 277:42919-25.
11. Stolze I, Mole D, Ratcliffe P. Regulation of HIF: prolyl hydroxylases. *Novartis Found Symp.* 2006; 272:15-25.
12. Wanqiu C, Vikram J, Jiping T, John H. HIF-1 alpha inhibition ameliorates neonatal brain damage after hypoxic-ischemic injury 2009; 102:395-9.
13. Zhaoyun P, Ping R, Zhimin K, Jing D, Qinglin L, Yun L, et al. Up-regulated HIF-1 α is involved in the hypoxic tolerance induced by hyperbaric oxygen preconditioning. 2008. 1212, 71-78. *Brain Research.* 2008; 1212:71-8.
14. Hiroaki O, Neil D, Keiko O, Jose D, Haruhiko Y, Sean F, et al. Hypoxia Inducible Factor-1 α Is Increased in Ischemic Retina: Temporal and Spatial Correlation with VEGF Expression. 1999; 40:182-9.
15. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989; 20:84-91.
16. Trisciuglio D. Bcl-2 regulates HIF-1 α protein stabilization in hypoxic melanoma cells via the molecular chaperone HSP90. *PLoS ONE* 5. 2010; 7:e11772.
17. Bigdeli MR, Khoshbaten A. In vivo preconditioning with normobaric hyperoxia induces ischemic tolerance partly by triggering tumor necrosis factor- α converting enzyme/tumor necrosis factor- α /nuclear factor. *Neuroscience.* 2008; 153:671-8.
18. Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharp F. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *Cereb Blood Flow Metab.* 1990; 10:290-3.
19. Kim Y, Chun Y, Park J, Kim C, Kim m. Involvement of adrenergic pathways in activation of catalase by myocardial ischemia reperfusion. *Am J Physiol.* 2002; 5:1450-8.
20. Samoilenko A. The role of hypoxia-inducible factor family (HIF) proteins in the regulation of cells physiologic responses to hypoxia. *Ukr Biokhim Zh.* 2010; 4:5-17.
21. Steven D, Salhanick M, Bryan B, et al. Hyperbaric Oxygen Reduces Acetaminophen Toxicity and Increases HIF Expression. *Academic Emergency Medicine.* 2006; 13:707-14.
22. Mohagheghi F, Bigdeli MR, Rasoulbian B, Hashemi P, Rashidi Pour M. The neuroprotective effect of olive leaf extract is related to improved blood-brain barrier permeability and brain edema in rat with experimental focal cerebral ischemia. *Phytomedicine.* 2011; 18:170-5.

Evaluation of HIF1 α expression in ischemic tolerance induced by intermittent normobaric hyperoxia in the rat model of stroke

Alavian F., MSc

PhD Student of Physiology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Hajizadeh S., Ph.D

Professor, Department of Physiology, Institute for Cognitive Science Studies, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Javan M., Ph.D

Associate Professor, Department of Physiology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Bigdeli MR., Ph.D

Assistant Professor, Department of Biology, School of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

Received:15/02/2012, Revised:14/04/2012, Accepted:17/05/2012

Corresponding author:

Dr. Sohrab Hajizadeh, Department of Physiology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
E-mail: hajizads@modares.ac.ir

Abstract

Background: Recent studies have shown that normobaric hyperoxia is effective in the treatment of acute ischemia, a phenomenon called preconditioning. However, the exact mechanism of this kind of preconditioning in vivo is not known. In this study, the effect of intermittent normobaric hyperoxia on expression of HIF1 α in a stroke model was investigated.

Materials and Methods: In this experimental study, rats were divided into 4 groups. Hyperoxia groups were exposed to 95% inspired oxygen for 4 h/day and 6 consecutive days. Oxygen concentration in the control groups was 21% (normoxia). After 24 h, rats in stroke groups were subjected to 60 min of right middle cerebral artery occlusion. After 24 h, reperfusion neurological deficit scores were assessed. The brain HIF1 α levels were analyzed by Western blot. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA, Bonferroni post-test, Fisher exact test, and GraphPad Prism 5 software.

Results The results of this study showed that HIF1 α levels increased in stroke groups compared with normoxia groups, while the amount of protein in hyperoxia groups was not significantly different from normoxia groups. Significantly increased HIF1 α levels were observed in hyperoxia stroke group. Also, hyperoxia improved neurological deficit scores from 8.83% down to 3.46%.

Conclusion: Hydroxylation, instability, and degradation of HIF1 α occurred following hyperoxia. In the stroke groups, lack of oxygen delivery to cells prevents hydroxylation and degradation of HIF1 α . In hyperoxia stroke group, inflammatory cytokines with increased ROS can induce increased expression of HIF1 α . (*Quarterly Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, Volume 19, Number 3, pp.287-295*).

Keywords: Hyperoxia, Stroke, Preconditioning, HIF1 α