Original Article

Neuroprotection Induced by Preconditioning with Prolonged and Intermittent Normobaric Hyperoxia Upregulate TNF-α Converting Enzyme and Increase NF-kB Activity in the Rat Stroke Model

MR. Bigdeli, Ph.D.
Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University

Corresponding Address: P.O.Box: 1983963113, Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
Email: bigdelimohammadreza@yahoo.com

Abstract

Received: 20/Nov/2007, Accepted: 2/Mar/2008

Objective: Ischemic preconditioning (IPC) is an endogenous phenomenon that can induce ischemic tolerance (IT) in variety of organs such as brain. In this study, we examined the intermittent and prolonged dose of normobaric hyperoxia (NBHO) in neurologic deficit scores, NF-kB activity, and TNF-α converting enzyme (TACE) expression.

Materials and Methods: The rats were divided to four main groups. First two groups were exposed to HO divided in prolonged (24hrs; PrHO) and intermittent (4h×6 days; InHO) groups. Second two groups acted as control groups and they were exposed to 21% oxygen with the following condition: in the same chamber (room air, RA), continuously (24hrs; Pr RA) and discontinuously (4h×6days; InRA). Each group was subdivided to three subgroups. After 24hrs, first subgroup was subjected to 60mins MCAO followed by 24hrs of reperfusion. Then, IT, induced by InHO and PrHO, was measured by neurologic deficit scores and infarct volume. Second and third subgroups were respectively called sham-operated subgroup and intact subgroup designed to assess the effect of HO on NF-kB activity and TNF-α converting enzyme expression.

Results: Our findings indicate that InHO and PrHO are involved in the induction of IT. Pretreatment with InHO and PrHO reduce neurologic deficit scores and infarct volume significantly. InHO and PrHO increase NF-kB activity and TNF-α converting enzyme expression with different degrees. Also, InHO with ischemia increase NF-kB activity and TNF-α converting enzyme expression significantly.

Conclusion: Although further studies are needed to clarify the mechanisms of ischemic tolerance, InHO and PrHO seem partly to exert their effects via increasing NF-kB activity and up regulation of TNF-α converting enzyme.

Keywords: Ischemic Preconditioning, TNF-α Converting Enzyme, Stroke, NF-kB Activity, Normobaric Hyperoxia

Yakhteh Medical Journal, Vol 10, No 2, Summer 2008, Pages: 137-144

بررسی میزان فعالیت فاکتور هسته‌ای کاپا B و بیان ژن آنزیم تبدیل کننده TNF-α در هیپرکسی نورمو باریک پیوسته و متناوب در مدل موش صحرایی دچار سکته مغزی

محمدرضا بیگدلی .Ph.D
دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی

آدرس نویسنده مسئول: تهران، صندوق پستی: ۱۹۸۳۹۶۳۱۱۳، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی
پست الکترونیک: **Email: bigdelimohammadreza@yahoo.com**

چکیده

دریافت مقاله: ۸۶/۸/۲۹، پذیرش مقاله: ۸۶/۱۲/۱۲

* **هدف:** بررسی اثر پیش شرطی‌سازی به واسطه هیپرکسی نورموباریک (Normobaric Hyperoxia: HO) پیوسته و متناوب بر میزان بیان آنزیم تبدیل کننده TNF-α و فعالیت NF-kB

* **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 HO و نورموکسی نورموباریک (Room Air: RA) قرار می‌گرفتند. هر گروه به سه زیرگروه تقسیم می‌شد. زیرگروه اول، بعد از ۲۴ ساعت، تحت جراحی انسداد شریان میانی مغز (Middle Cerebral Artery Occlusion: MCAO) به مدت ۶۰ دقیقه قرار می‌گرفتند و سپس ۲۴ ساعت به آنها اجازه برقراری مجدد جریان خون داده می‌شد. زیرگروه دوم و سوم به نام زیر گروه شم (بدون MCAO) و گروه دست نخورده (بدون جراحی) برای بررسی اثر هیپرکسی نورموباریک بر بیان آنزیم تبدیل کننده TNF-α و فعالیت NF-kB در نظر گرفته شده بود.

* **یافته‌ها:** یافته‌ها نشان داد HO متناوب و پیوسته در القای پدیده تحمل به ایسکمی دخالت دارند. پیش درمان با HO پیوسته و متناوب بیان آنزیم تبدیل کننده TNF-α و فعالیت NF-kB را به طور معنی‌دار افزایش می‌دهد. آثار پدیده تحمل به ایسکمی بر بیان آنزیم تبدیل کننده TNF-α فعالیت NF-kB در روش‌های پیوسته و متناوب یکسان نبودند و HO پیوسته نسبت به متناوب اثر قوی‌تری داشت.

* **نتیجه‌گیری:** نتایج این تحقیق نشان می‌دهد هیپرکسی نورموباریک آثار حفاظت عصبی خود را احتمالا تاحدی از طریق افزایش فعالیت NF-kB و میزان بیان آنزیم تبدیل کننده TNF-α نشان می‌دهد.

کلیدواژگان: پیش شرطی‌سازی به ایسکمی، آنزیم تبدیل کننده TNF-α، سکته مغزی، فعالیت NF-kB، هیپرکسی نورموباریک

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دهم، شماره ۲، تابستان ۸۷، صفحات: ۱۴۴-۱۳۷

مقدمه

تحریکات آسیب‌رسان در دوزهای پایین و کم، البته زیر آستانه آسیب‌رسان به سلول، نوعی پاسخ سازشی القا می‌کند که مغز را در برابر استرس‌های دیگر حاصل از همین تحریکات آسیب‌رسان تحمل (Tolerance) یا دیگر تحریکات آسیب‌رسان تحمل متقابل (Cross Tolerance) حفاظت می‌کند (۱). در بین استرس‌های مختلف، هیپوکسی (۲)، ایسکمی (۳)، تشنج (۴)، آنوکسی (۵)، افسردگی منتشر (Spreading Depression) (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 (Ischemic Tolerance) (کامل یا کانونی) را القا می‌کنند. پیاده‌سازی روش‌های مذکور برای ایجاد پدیده تحمل به ایسکمی به علت آثار سمی یا زیان‌بار آنها در انسان امکان‌پذیر نیست. بدین ترتیب به علت آثار زیان بار نسبتا کم HO برای ایجاد پدیده تحمل به ایسکمی، این روش به مقدار زیادی مورد توجه قرار گرفته است. چندین گزارش وجود دارد که هیپرکسی نیز باعث بروز تحمل به ایسکمی می‌شود (۱۱، ۱۲).

پیش شرطی‌سازی (Preconditioning) 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). آثار مفید پیش شرطی سازی اولین بار در قلب نشان داده شد. اکنون روشن شده است که پیش شرطی‌سازی می‌تواند تحمل به ایسکمی را در اندام‌ها و دستگاه‌های مختلف از جمله مغز، قلب، کبد، روده کوچک، عضله اسکلتی، و ریه‌ها القا کند (۱۴). اخیرا فاکتور تومور نکروز-آلفا (TNF-α) در مکانیسم‌هایی حفاظت مغزی در برابر آسیب های حاصل از ایسکمی به مقدار زیادی مورد تاکید قرار گرفته است (۱۵، ۱۶). با در نظر گرفتن نقش حفاظت مغزی (TNF-α)، برخی مطالعات نشان داده‌اند که TNF-α به عنوان یک میانجی کلیدی در IPC (Ischemic Preconditioning) عمل می‌کند (۱۷، ۱۸). TNF-α به واسطه پروتئاز متصل به غشا به حالت محلول رها می‌شود. این آنزیم به عنوان پروتئین غیرجامعیت دهنده (دیس‌اینتگرین) و متالوپروتئیناز (A Disintegrin and Metalloproteinase: ADAM) موسوم به آنزیم تبدیل کننده TNF-α (TNF-α converting enzyme: TACE/ADAM) عمل می‌کند (۱۹). همچنین، محققان اخیرا نشان داده‌اند بعد از پیش شرطی‌سازی 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 (Neuroprotection) ایفا می‌کند (۲۰). نتایج نشان می‌دهد افزایش القای محرومیت اکسیژن و گلوکز (Oxygen glucose deprivation: OGD)، گلوتامات خارج سلولی را در محیط‌های کشت که در معرض پیش شرطی 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 می‌شود (۳، ۲۱). رابطه بین

TNF-α، آنزیم TACE و NF-kB قبلا نشان داده شده است (۱۹، ۲۲، ۲۳). آنزیم NF-kB در سطح سیتوپلاسم به صورت غیرفعال و متصل به فاکتور مهارکننده (IkB) قرار دارد. برای فعال شدن آنزیم NF-kB باید فاکتور مهارکننده فسفوریله شده و از NF-kB جدا شود. بدین ترتیب با اندازه‌گیری غلظت Phospho-IkB میزان فعالیت آنزیم NF-kB مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. درگیری آنزیم TACE و TNF-α در پیش شرطی سازی حاصل از محرومیت اکسیژن و گلوکز در شرایط *In vitro* به اثبات رسیده است (۱، ۲۱، ۲۴). اما اثر هیپرکسی بر میزان بیان ژن آنزیم تبدیل کننده TNF-α و سطح سرم TNF-α در شرایط *In vitro* و *In vivo* هنوز ناشناخته است. چرا که نشان داده شده است هیپرکسی ۲۴ ساعته می‌تواند پدیده تحمل به ایسکمی ایجاد کند (۱۱، ۱۲، ۲۴). از طرف دیگر نشان داده شده است هیپرکسی ۲۴ ساعته آثار سمی شدیدی بر ریه‌ها دارد (۲۵) و هیپرکسی در زمان‌های کوتاه آثار سمی کمتری دارد ولی نمی‌تواند پدیده تحمل به ایسکمی ایجاد کند (۱۱). همچنین نشان داده شده است که هیپرکسی در زمان‌های کوتاه اما متناوب می‌تواند پدیده تحمل به ایسکمی ایجاد کند (۲۴). به همین جهت بررسی مکانیسم مولکولی هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب ضروری به نظر می‌رسد.

اهداف اصلی در این مطالعه عبارتند از: ۱. بررسی اثر حفاظت عصبی حاصل از هیپرکسی نورموباریک متناوب و پیوسته بر نقص های نورولوژیک و حجم آسیب بافتی در مغز ۲. بررسی اثر حفاظت عصبی حاصل از هیپرکسی نورموباریک متناوب و پیوسته بر فعالیت NF-kB ۳. بررسی اثر حفاظت عصبی حاصل از هیپرکسی نورموباریک متناوب و پیوسته بر میزان بیان ژن آنزیم تبدیل کننده TNF-α (TACE) ۴۸ ساعت بعد از پیش درمان تا زمان کافی برای انجام کلیه واکنش‌های احتمالی داخل سلولی وجود داشته باشد.

مواد و روش‌ها

گروه بندی حیوان آزمایشگاهی

رت‌های اسپیراگو-دالی (۳۵۰-۲۵۰گرم) به طور تصادفی به چهار گروه حاوی ۲۱ حیوان تقسیم می‌شدند. دو گروه، درون جعبه اکسیژن با غلظت بالای ۹۰ درصد تحت عنوان شرایط هیپرکسی قرار داده می‌شدند. از این دو گروه، یک گروه به صورت پیوسته (۲۴ ساعت، Pr-HO) و دیگری به صورت متناوب (۴ساعت در روز به مدت ۶ روز، InHO) در معرض اکسیژن بالای ۹۰ درصد قرار می‌گرفتند. دو گروه دیگر وضعیت مشابه با دو گروه اول داشتند با این تفاوت که یک گروه به صورت پیوسته (۲۴ ساعت، PrRA) و دیگری به صورت متناوب (۴ساعت در روز به مدت ۶ روز، InRA) در معرض اکسیژن ۲۱ درصد قرار می‌گرفتند. حیوان‌ها سپس به مدت ۲۴ ساعت در هوای اتاق (۲۱ درصد) قرار می‌گرفتند. هر کدام از این گروه‌ها به سه زیر گروه تقسیم می‌شدند. زیرگروه‌های اول به مدت ۶۰ دقیقه تحت جراحی انسداد شریان مرکزی (Middle Cerebral Artery Occlusion: MCAO) قرار می‌گرفتند. ۲۴ ساعت بعد از لحاظ نقص‌های حرکتی نورولوژیک مورد مطالعه قرار می‌گرفتند. زیر گروه‌های دوم به عنوان گروه شم برنامه آزمایشی گروه اول را دریافت می‌کردند با این تفاوت که جراحی بدون MCAO در این حیوانات صورت می‌گرفت (S-PrHO, S-PrRA, S-InHO, S-InRA). زیر گروه‌های سوم به عنوان گروه دست نخورده برنامه آزمایشی گروه اول را دریافت می‌کردند با این تفاوت که هیچ گونه جراحی در آنها صورت نمی‌گرفت (گروه دست نخورده با علامت I نشان داده می‌شود مانند I-PrHO, I-PrRA, I-InHO, I-InRA). این دو گروه برای بررسی اثر خالص پیش شرطی‌سازی با هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب بر میزان بیان ژن آنزیم تبدیل کننده TNF-α و سطح فعالیت NF-kB طراحی شده بودند. ۴۸ ساعت بعد از پیش درمان با هیپرکسی نورموباریک، در زیر گروه‌های دوم و سوم که سکته مغزی دریافت نکرده بودند، برای ارزیابی سطح آنزیم تبدیل کننده TNF-α نمونه‌گیری مغزی انجام می‌شد. همین طور در زیر گروه‌های دوم و سوم که سکته مغزی دریافت نکرده بودند، برای ارزیابی سطح فعالیت NF-kB به طور مجزا در دو گروه ۱ ساعت و ۴۸ ساعت بعد از تیمار با اکسیژن به منظور اندازه‌گیری غلظت Phospho-IkB نمونه‌گیری مغزی انجام می‌شد.

جعبه هیپرکسی

۹ رت داخل یک جعبه که تمامی درزهای آن به طور کامل گرفته شده بود به ابعاد (۳۰×۳۵×۶۵) با دو مجرای ورودی و خروجی قرار داده می‌شد. ماده‌ای به نام سودا لیم (soda lime) (جاذب دی‌اکسیدکربن) زیر جعبه قرار می‌گرفت تا دی‌اکسیدکربن تولیدی را جذب کند. بدین ترتیب، امکان تغییر غلظت گاز داخل جعبه به حداقل می‌رسید. اکسیژن خالص (F_IO_2=۰/۹۵) یا هوای اتاق به میزان ۳ لیتر در دقیقه برای تیمار جانوران به جعبه حاوی رت‌ها متصل می‌شد. برای افزایش دقت آزمایش یک الکترود سنجش اکسیژن نیز کنار جعبه تعبیه می‌شد تا غلظت اکسیژن داخل جعبه را اندازه‌گیری کند. آزمایش گازهای خون شریانی (Arterial Blood Gases: ABG) در هر دو آزمایش صورت می‌گرفت.

ایجاد مدل سکته مغزی (انسداد شریان مرکزی مغز)

رت‌ها بعد از توزین، با داروی کلرات هیدرات (مرک، آلمان) به میزان ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن بی‌هوش می‌شدند. جراحی مدل‌سازی MCAO مطابق دستورالعمل لونگا و همکارانش انجام می‌شد (۲۶). به طور خلاصه، تحت جراحی میکروسکوپی، یک نخ بخیه نایلون از طریق تنه (External Carotid Artery: ECA) وارد رگ شریانی راست می‌شد و تا رسیدن به ACA (Anterior Cerebral Artery) از میان (Internal Carotid Artery: ICA) با پتریگوپالاتین بسته ادامه داده می‌شد. در اثر تماس نخ بخیه و ACA جریان خون از هر طرف به (Middle Cerebral Artery: MCA) بسته می‌شد. این بسته شدن از طریق احساس مقاومت و در پیشروی نخ و ورود حدود ۲۰ میلی‌متر طول نخ از تنه ECA مشخص می‌شد. بعد از ۶۰ دقیقه ایسکمی، برقراری مجدد جریان خون صورت می‌گرفت. دمای بدن از طریق رکتوم اندازه‌گیری می‌شد و میزان دما در حدود ۳۷ درجه سانتی‌گراد حفظ می‌شد (۲۶).

ارزیابی رفتاری حاصل از سکته

معاینه‌های نورولوژیک بعد از ۲۴ ساعت انجام می‌شد. در طول ۲۴ ساعت بعد از شروع انسداد تا کشته شدن حیوان، مراقبت‌های ویژه انجام می‌شد. یافته‌های نورولوژیکی در پنج 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 سه (افتادن به سمت چپ) نقص کانونی شدید هستند؛ و رت‌های شماره چهار به طور خود به‌خودی نمی‌توانند راه بروند و سطح هوشیاری پایین دارند (۲۶).

ارزیابی حجم سکته مغزی

۴۸ ساعت بعد از پیش درمان و کشتن رت‌ها با کلرال هیدرات (۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن)، سر آنها جدا و مغزها به سرعت خارج می‌شد و در سالین ۴ درجه به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری می‌شد. هشت برش به ضخامت ۲ میلی‌متر به صورت کرونال به واسطه دستگاه ماتریکس مغز تهیه می‌شد که شروع آنها از پیاز بویایی بود. برش‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه در محلول ۲ درصد ۲، ۳، ۵ تری‌فنیل تترازولیوم کلراید نگهداری می‌شد. سپس بلافاصله با دوربین دیجیتال (نوکیا ۶۶۳۰) که قابل اتصال به کامپیوتر بود تصویربرداری انجام می‌گرفت. بعد از انتقال تصاویر به کامپیوتر به واسطه نرم‌افزار (Image Tools) مساحت نواحی سفید و قرمز به ترتیب به عنوان نواحی آسیب دیده و سالم اندازه‌گیری می‌شد. حجم نواحی آسیب دیده و سالم برش‌ها از طریق محاسبه حاصل‌ضرب مساحت نواحی مذکور برش‌ها در ضخامت ۲ میلی‌متر برش به دست می‌آمد و سپس به واسطه معادله زیر حجم اصلاح شده ناحیه آسیب دیده محاسبه می‌شد (۲۶).

حجم اصلاح شده ناحیه آسیب دیده = (حجم ناحیه آسیب دیده – حجم نیمکره راست)- حجم نیمکره چپ

وسترن بلات

ابتدا برای هموژن کردن بافت مغز (۴۸ ساعت بعد از پیش درمان)، بافر هموژن به صورت زیر آماده می‌شد. بافر حاوی ۳۲۰ میلی‌مولار سوکروز (مرک، آلمان)، یک میلی‌مولار دی-ال دی‌تیوتریتول (DL-dithiothreitol)، ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مهار کننده تریپسین سویبین (Soybean Trypsin Inhibitor) (مرک، آلمان)، ۰/۲ درصد SDS (مرک، آلمان)، ۱۰۰ میکرومولار ۱۰، ۱- فنانترولین (1,10-Phenanthroline) (مرک، آلمان)، یک درصد PMSF و ۵۰ میلی‌مولار تریس (بوهرینگر-مانهیم، آلمان)، بود که در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد با HCl به pH=7 رسانده می‌شد (۱).

در مرحله بعد حدود ۱۵۰ میلی‌گرم بافت مغز از ناحیه هم سو با ناحیه آسیب مغزی جدا می‌شد. بافت جدا شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۴ حجم حاوی بافر هموژن قرار می‌گرفت (۱۹). سپس، پروتئین‌ها بر اساس اندازه در (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamid Gel Electrophoresis: SDS-PAGE) ۱۰درصد همراه نردبان وزن مولکولی پروتئینی (Fermentas, SM0671) جدا می‌شدند. پروتئین‌ها بر روی غشای (Poly Vanlidine Difluride: PVDF) با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال 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 می شدند. آنزیم‌های تبدیل کننده TNF-α و بتا-اکتین به واسطه آنتی‌بادی اختصاصی اولیه شناسایی می‌شدند و به آنها اتصال می یافتند. سپس آنتی‌بادی‌های ثانویه اختصاصی خرگوش متصل به HRP (Hourse Radish Peroxidase) (Dakocytomation, Denmark) برای ناسایی آنتی‌بادی‌های علیه آنزیم تبدیل کننده TNF-α بتا-اکتین با رقت ۱:۱۰۰۰۰ مورد استفاده قرار می‌گرفت. انکوباسیون آنتی‌بادی ثانویه به مدت یک ساعت در دمای اتاق صورت می‌گرفت. بعد از شست‌وشوی غشای PVDF، مخلوطی از سوبسترای A, B (ECL, Amersham Biosciences) در تاریکی بر روی غشا اضافه می‌شد و در اثر واکنش آنها با HRP نور تولید می‌شد. آنگاه فیلم حساس رادیولوژی به مدت ۱ دقیقه بر روی بلات قرار می‌گرفت تا فیلم رادیولوژی را متاثر سازد. بدین ترتیب وجود پروتئین آشکار می‌شد.

آزمایش الایزا Phospho-IκBα

۴۸ ساعت بعد از پیش درمان و انجام نمونه‌گیری مغزی، Phospho-IκBα به واسطه کیت اندازه گیری Phospho-IκBα بر اساس دستورالعمل کیت انجام می‌شد (Alexis, Biochemicals). به طور خلاصه، ۵ میلی‌گرم از بافت مغزی ناحیه هم‌سو در نیم‌کره غیرایسکمی در محلول بافر فسفات سرد در دمای ۴ درجه جدا می‌شد. آنگاه، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه همراه با بافر لیزکننده با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ می‌شد. محلول سوپرناتانت برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین جمع‌آوری می‌شد. محلول سلول‌های لیز شده تا غلظت ۱ میلی گرم در میلی‌لیتر در بافر بلوک کننده رقیق می‌شد. سپس آنتی‌بادی آشکار کننده در محلول بلوک کننده با رقت ۱:۲۰۰ اضافه می‌شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه می‌شد. بعد از شست‌وشو Strep-HRP با رقت ۱:۱۰۰۰ اضافه می‌شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه می‌شد. بعد از شست‌وشو، محلول سوبسترا به چاهک‌ها اضافه می‌شد و در فاصله ۲ تا ۱۰ دقیقه بعد از افزودن سوبسترا میزان نور تولیدی توسط لومیناتور (Chemiluminescence Immunoassay analyzer, China) اندازه‌گیری می‌شد.

آنالیز آماری

سطح Phospho-IκBα و میزان بیان آنزیم تبدیل کننده TNF-α، و میزان گازهای خون شریانی با استفاده از one-way ANOVA مورد آنالیز قرار می‌گرفت. امتیازهای نقص نورولوژیک با استفاده از آزمون Mann-Whitney U مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گرفت. داده‌ها به صورت Mean±SEM نمایش داده می‌شود. $p<0/05$ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شده‌اند.

یافته‌ها

پارامترهای شرایط آزمایش

جدول ۱ محتوی اکسیژن داخل جعبه اکسیژن را در شرایط هیپرکسی و نورموکسی نورموباریک نشان می‌دهد. بر اساس ارزیابی‌های آزمایش گازهای خون شریانی فشار اکسیژن شریانی در شرایط هیپرکسی بسیار بالاتر از فشار اکسیژن شریانی در شرایط نورموکسی است.

آثار هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب بر امتیازهای نقص نورولوژیک

میانه امتیازهای نقص نورولوژیک (NDS) به واسطه قرارگیری در معرض هیپرکسی نورموباریک به طور قابل ملاحظه کاهش

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

گروه‌های آزمایشی	pH	PCO_2 (mmHg)	PO_2 (mmHg)	میزان تنفس (هرتز)
RA متناوب	۷/۴± ۰/۰۲	۴۱/۶±۰/۷۵	۹۲/۳±۱/۲۵	۱/۶۱±۰/۰۴
HO متناوب	۷/۳±۰/۰۱	۳۹/۰±۰/۳	۳۶۰ ±۷/۴۵*	۱/۳±۰/۰۹
RA پیوسته	۷/۳۷±۰/۰۲	۴۰/۳±۰/۷۵	۹۳/۱±۰/۸۳	۱/۵۹±۰/۰۸
HO پیوسته	۷/۳۵±۰/۰۲	۳۹/۳±۱/۳	۳۵۵ ±۵/۲*	۱/۲۹±۰/۰۴

*: p<۰/۰۰۱

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

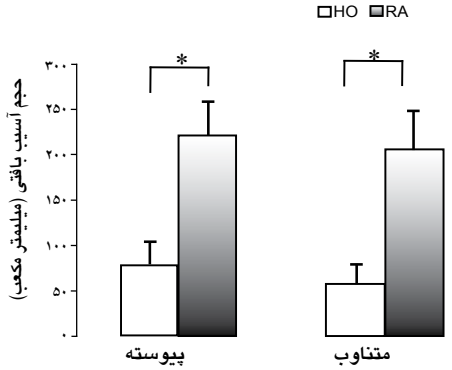
گروه‌های آزمایشی	تعداد نقص‌های نورولوژیک در هر گروه					تعداد کل	میانه
	۰	۱	۲	۳	۴		
نورموکسی نورموباریک متناوب (InRA)	۰	۳	۴	۲	۰	۹	۲
هیپرکسی نورموباریک متناوب (InHO) *	۵	۳	۱	۰	۰	۹	۰
نورموکسی نورموباریک پیوسته (PrRA)	۰	۴	۴	۱	۰	۹	۲
هیپرکسی نورموباریک پیوسته (PrHO) *	۳	۵	۱	۰	۰	۹	۱

همان طور که ملاحظه می شود مقایسه گروه های ردیف InRA :InHO و PrRA: PrHO معنی دار است (p<0/05) اما InHO:PrHO معنی دار نیست.

می‌یابد. میانه امتیازهای نقص نورولوژیک در گروه‌های هیپرکسی نومباریک 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 سکته مشاهده می‌شد. این مدرک نشان می‌دهد 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.

آثار هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب بر حجم آسیب بافتی

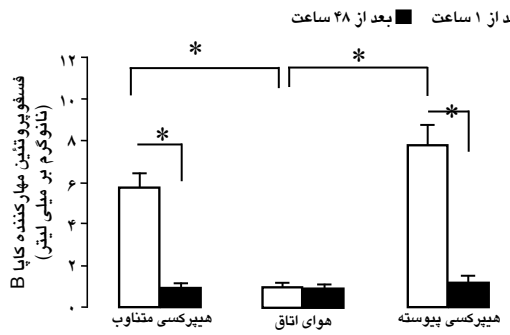
شکل ۱ نشان می‌دهد هیپرکسی نورموباریک پیوسته (PrHO) و متناوب (InHO) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (RA) باعث کاهش حجم آسیب بافتی می‌شود. تفاوت آماری گروه‌های هیپرکسی نورموباریک پیوسته (PrHO) و متناوب (InHO) معنی‌دار نیست. تفاوت آماری گروه‌های مذکور نسبت به گروه شم نورموکسی نورموباریک معنی‌دار است. کاهش حجم آسیب بافتی و نقص‌های نورولوژیک اثر پدیده تحمل به ایسکمی حاصل از هیپرکسی را اثبات می کند.



شکل ۱: اثر شرایط هیپرکسی نورموباریک (HO) و نورموکسی نورموباریک (RA) متناوب و پیوسته را بر روی حجم آسیب بافتی ۴۸ ساعت بعد از پیش درمان (p<۰/۰۵=*).

آثار هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب بر سطح Phospho-IκBα

شکل ۲ نشان می‌دهد هیپرکسی نورموباریک پیوسته (PrHO) و متناوب (InHO) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (RA) باعث افزایش غلظت Phospho-IκBα در یک ساعت بعد از پایان پیش درمان هیپرکسی می‌شدند. اما ۴۸ ساعت بعد از هیپرکسی نورموباریک پیوسته (PrHO) و متناوب (InHO) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (RA) افزایشی در غلظت Phospho-IκBα مشاهده نمی‌شد (شکل ۲). تفاوت آماری گروه‌های هیپرکسی نورموباریک پیوسته (PrHO) و متناوب (InHO) معنی‌دار است و نشان می‌دهد اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته بر روی افزایش غلظت Phospho-IκBα به طور قابل توجهی بیشتر است (شکل ۲) (p<۰/۰۱).

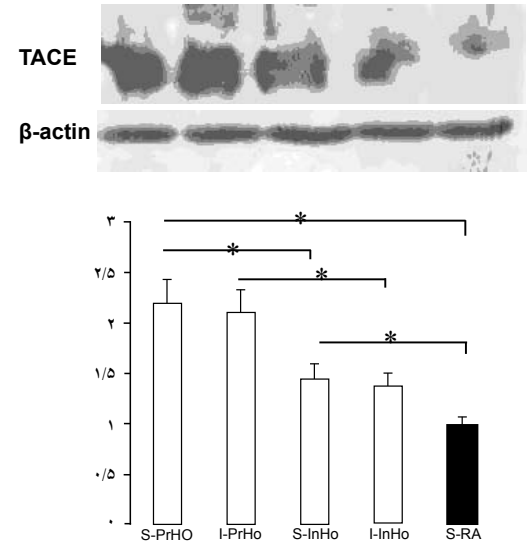


شکل ۲: سطوح Phospho-IκBα را یک و ۴۸ ساعت بعد از پیش درمان با هیپرکسی نورموباریک (HO) در حالت متناوب (InHO) و در حالت پیوسته (ProHO) و نورموکسی نورموباریک (RA) را در گروه دست نخورده (I) (p<۰/۰۱=*).

آثار هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب بر میزان بیان ژن آنزیم تبدیل کننده TNF-α

شکل ۳ نشان می‌دهد هیپرکسی نورموباریک پیوسته (S-PrHO) و متناوب (S-InHO) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (S-RA) باعث افزایش بیان ژن آنزیم تبدیل کننده TNF-α می‌شود. تفاوت آماری گروه‌های هیپرکسی نورموباریک

پیوسته (PrHO) و متناوب (InHO) معنی‌دار است و نشان می‌دهد اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته بر روی افزایش بیان ژن آنزیم تبدیل کننده TNF-α به طور قابل توجهی بیشتر است. تفاوت آماری گروه‌های مذکور نسبت به گروه شم نورموکسی نورموباریک معنی‌دار است.



شکل ۳: آنالیز وسترن بلات TACE در مغز رت های حاصل از گروه‌های آزمایش مختلف ۴۸ ساعت بعد از هیپرکسی نورموباریک (HO) در حالت متناوب (InHO) و در حالت پیوسته (ProHO) و نورموکسی نورموباریک (RA) در گروه دست نخورده (I) و شم (S). پانل پایینی تصویر آنالیز باندهای اکتین که برای نرمالیزاسیون باندهای و کنترل مورد استفاده قرار می‌گیرند را نشان می‌دهد.

بحث

در این تحقیق نشان داده شده است که هیپرکسی نورموباریک متناوب و پیوسته در مقایسه با نورموکسی نورموباریک باعث ایجاد پدیده تحمل به ایسکمی می‌شود و می‌تواند نقص‌های نورولوژیک و حجم آسیب بافتی را کاهش دهد. همچنین نشان داده شده است که هیپرکسی نورموباریک متناوب و پیوسته از طریق افزایش فسفوریلاسیون فاکتور مهار کننده NF-kB (Phospho-IkB) سطح فعالیت این آنزیم را افزایش می‌دهد. در این تحقیق نشان داده شده است که هیپرکسی نورموباریک متناوب و پیوسته باعث افزایش بیان آنزیم تبدیل کننده TNF-a نیز می‌شود که قبلا افزایش بیان آن در سایر روش‌های پیش شرطی‌سازی اثبات شده بود (۱، ۲۰).

قبلا نشان داده شده است که هیپرکسی ۲۴ ساعته می‌تواند پدیده تحمل به ایسکمی ایجاد کند (۱۱، ۱۲، ۲۴). از طرف دیگر نشان داده شده است که هیپرکسی ۲۴ ساعته آثار سمی شدیدی بر ریه‌ها دارد (۲۵) و هیپرکسی در زمان‌های کوتاه آثار سمی کمتری دارد ولی نمی‌تواند پدیده تحمل به ایسکمی ایجاد کند (۱۱). همچنین نشان داده شده است که هیپرکسی در زمان‌های کوتاه اما متناوب می‌تواند پدیده تحمل به ایسکمی ایجاد کند (۲۴). نتایج این تحقیق نیز نشان می‌دهد که پیش شرطی‌سازی با هیپرکسی، هم در حالت پیوسته و هم متناوب باعث افزایش فعالیت NF-kB می‌شود و احتمالا از این طریق (۱، ۲۰) باعث افزایش بیان ژن TACE می‌شود. همان طور که نتایج نشان می‌دهد اثر هیپرکسی پیوسته بر افزایش فعالیت NF-kB بیشتر از هیپرکسی متناوب است.

بر اساس نتایج این مطالعه که در شرایط استاندارد و با استفاده از مدل جراحی معتبر و قابل تکرار MCAO لونگا و همکارانش (۲۶) در ایجاد مدل سکته مغزی استفاده شده است، مشاهده می‌شود 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 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 پدیده متحمل به ایسکمی را نشان نمی‌دهند و با تزریق رفته گرهای ROS دقیقا 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، احتمالا با افزایش ROS مسیر پیام‌رسانی سلولی پیش شرطی‌سازی ایسکمی را به راه می‌اندازد.

در پژوهش قبل نشان دادیم که هیپرکسی نورموباریک متناوب باعث ایجاد تحمل به ایسکمی در مغز می‌شود (۲۴). همچنین نشان داده شده است که ۴ ساعت هیپرکسی نورموباریک منفرد پدیده تحمل به ایسکمی را در مغز نشان نمی‌دهد (۱۱). دونگ و همکارانش نشان داده‌اند که پیش درمان با هیپرکسی هیپرباریک (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 القای تحمل به ایسکمی، عوارض جانبی، و مسمومیت‌های آن بر روی بدن اهمیت دارد.

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب باعث افزایش غلظت Phospho-IκBα می‌شود. پروتئین Phospho-IκBα در اثر فسفوریلاسیون پروتئین مهاری کاپا بی (IkB) به وجود می‌آید و بدین ترتیب از NF-κB جدا می‌شود و با جدا شدن IkB این آنزیم فعال می‌شود. بنابراین غلظت Phospho-IκBα نشانگر میزان فعالیت آنزیم NF-κB است. از طرف دیگر، هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب باعث افزایش بیان ژن آنزیم تبدیل کننده TNF-α می‌شود. تاکنون گزارشی مبنی بر افزایش بیان ژن آنزیم تبدیل کننده TNF-α به واسطه هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب در مغز نشان داده نشده است. اما شواهدی وجود دارد که میزان بیان آنزیم تبدیل کننده 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 مشاهده نمی‌شود (۱۹). همچنین نشان داده شده است که اگر TNF-α به صورت پیش درمان استفاده شود می‌تواند پدیده تحمل به ایسکمی را به وجود آورد (۱۹). بنابراین نتایج این پژوهش با نتایج سایر محققان هم‌خوانی دارد.

با توجه به نتایج فوق، برخی نشان داده‌اند که TNF-α به عنوان یک میانجی کلیدی در پدیده تحمل به ایسکمی عمل می کند (۱۸). همچنین نشان داده شده است که در پیش شرطی‌سازی ایسکمی میزان بیان ژن TACE افزایش می‌یابد (۱۹). بنابراین، مکانیسم احتمالی که می‌توان در این زمینه پیش‌بینی کرد آن است که هیپرکسی باعث تولید TNF-α می‌شود. سپس TNF-α از طریق گیرنده خود باعث به راه افتادن مسیر پیام‌رسانی NF-κB در داخل سلول می‌شود (۱، ۱۹). آنگاه، فاکتور نسخه‌برداری NF-κB باعث

افزایش بیان گروهی از ژن های پیش شرطی‌سازی ایسکمی می‌شود و توان بقای سلول‌های عصبی را افزایش می‌دهد.

به رغم 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 (۲۵). نتایج سایر محققان نشان می‌دهد هیپرکسی نورموباریک پیوسته کمتر از ۲۴ ساعت آثار تحمل به ایسکمی را نشان نمی‌دهد (۱۱). شواهد نشان می‌دهد قرار گرفتن در معرض اکسیژن ۹۵درصد به مدت ۲۴ساعت منجر به احتقان شدید ریوی می‌شود که در آن گلبول‌های قرمز خون از رگ خارج شده، ادم و تغییر در ساختمان آلوئولی اتفاق می‌افتد. حتی بعد از ۲ هفته نیز بهبودی ساختمان آلوئولی کامل نمی‌شود. بنابراین، تجویز اکسیژن به صورت پیوسته منجر به اختلال عملکردی ریه‌ها می‌شود (۲۵). مدارک دیگر نشان می‌هد پدیده حفاظت (Protection) 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 (۲۷). بنابراین، با در نظر گرفتن نتایج فوق هیپرکسی متناوب، اندکی سمی شدن و آثار تحمل به ایسکمی نیز القا می‌کند.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق مقایسه نتایج دو روش پیوسته و متناوب نشان داد که هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب موجب کاهش امتیاز نقص نورولوژیک و حجم آسیب بافتی در اثر سکته مغزی می‌شوند. همچنین نشان داده شده است که هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب هر دو موجب افزایش بیان ژن TACE می‌شوند. 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. از طرف دیگر، به دلیل این که در پیوندهای بافتی یا اندامی مهمترین آسیبی که به بافت یا اندام وارد می‌شود نرسیدن اکسیژن و مواد غذایی در حین انتقال بافت از فرد دهنده به فرد گیرنده است که پدیده‌ای مشابه ایسکمی دارد؛ با استفاده از پدیده تحمل به ایسکمی می‌توان این آسیب را به مقدار زیاد کاهش داد و موفقیت پیوند بافتی را بهبود بخشید.

References

1. Romera C, Hurtado O, Botella S, Lizasoain I, Cardenas A, Fernandez-Tome P, et al. 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, et al. 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, et al. Transient hyperthermia protects against subsequent forebrain ischemic cell damage in the rat. Neurology. 1989; 39: 1396-1398
8. 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: 246-252
9. Patel AJ, Honore´ E, Maingret F, Lesage F, Fink M, Duprat F, et al. 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, Kempski O, et al. 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, et al. 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: 907-912
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. Barone FC, Feuerstein GZ. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. J Cereb Blood Flow Metab. Nat Med. 2002; 8: 1363-1368
16. Hallenbeck JM. The many faces of tumor necrosis factor in stroke. Nat Med. 2002; 8: 1363-1368
17. 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
18. Wang X, Li X, Erhardt JA, Barone FC, Feurstein GZ. Detection of TNF-α mRNA induction in ischemic brain tolerance by means of real time polymerase chain reaction. J Cereb Blood Flow Metab. 2000; 20:

15-20
19. Hurtado O, Lizasoain I, Fernandez-Tome P, Alvarez-Barrientos A, Leza JC, Lorenzo P, et al. 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
20. Pradillo J, Hurtado O, Romera C, Cardenas A, Fernandez-Tome P, Alonso-Escolano D, et al. TNF-R1 mediayes increased neuronal membrane EAAT3 experession after in vivo cerebral ischemic preconditioning. J Neurosci. 2006; 138: 1171-1178
21. Edwards RJ, Saurin AT, Rakhit RD, Marber MS. Therapeutic potential of ischemic preconditioning. Br J Clin Pharmacol. 2000; 50: 87-97
22. Shohami E, Ginis I, Hallenbeck JM. Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. Cytokine Growth Factor Rev. 1999; 10: 119-130
23. Biton R, Booker G. The subtle side to hypoxia inducible factor (HIF-α) regulation. Eur J Biochem. 2003; 270: 791-798
24. 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: 228-233
25. Al-Motabagani M. Histological changes in the alveolar structure of the lung after exposure to hyperoxia. Ital J Anat Embryol. 2005; 110(4): 209-223
26. Longa E, Weinstein P, Carlson S, BS, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. stroke. 1989; 20: 84-91
27. Milano G, Corno A, Lippa S, Segesser L, Samaja M. Chronic and intermittent hypoxia induces different degrees of myocardial tolerance to hypoixia-induced dysfunction. Exp Biol Med; 2002; 227(6): 389-397