

بررسی میزان بیان آنزیم تبدیل‌کننده‌ی TNF-a (TACE) و سطح فعالیت NF-kB در پدیده‌ی تحمل به ایسکمی حاصل از هیپیرکسی نورموباریک متناوب در مدل موش صحرایی سکنه‌ی مغزی

دکتر مهدی رهنما*، دکتر محمدرضا بیگدلی**

نویسنده‌ی مسئول: زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه زیست‌شناسی meh_rahnama@yahoo.com

دریافت: ۸۶/۹/۳ پذیرش: ۸۶/۱۱/۱۵

چکیده

مقدمه: مطالعات اخیر بیان می‌کند که هیپیرکسی نورموباریک (HO) متناوب و پیوسته باعث ایجاد پدیده‌ی تحمل به ایسکمی به منظور کاهش آسیب‌های مغزی حاصل از ایسکمی می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی اثر هیپیرکسی متناوب به تنهایی و هیپیرکسی متناوب توأم با ایسکمی بر تغییرات بیان آنزیم تبدیل‌کننده‌ی TNF-a (TACE) و سطح فعالیت NF-kB است.

روش بررسی: ۴۰ سر موش صحرایی به دو گروه آزمایشی تقسیم شدند 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 درصد قرار گرفتند (InHO). گروه دوم به عنوان گروه کنترل نظیر گروه اول به صورت متناوب (۴ ساعت در روز به مدت ۶ روز) در معرض اکسیژن ۲۱ درصد (هوای اتاق) قرار گرفتند (InRA). هر گروه به سه زیرگروه به نام زیرگروه انسداد شریان مرکزی مغز (MCAO)، گروه شم MCAO (جراحی بدون ایسکمی MCAO) و زیرگروه دست‌نخورده (بدون هیچ‌گونه جراحی) تقسیم شدند. بعد از ۲۴ ساعت برقراری جریان خون مجدد بعد از ۶۰ دقیقه ایسکمی، میزان نقص نورولوژیک (NDS) و حجم آسیب بافتی در زیرگروه MCAO بررسی شد. بلافاصله و ۴۸ ساعت بعد از پیش‌درمان، نمونه‌گیری به منظور اندازه‌گیری سطح فعالیت NF-kB انجام شد. به این ترتیب اثر HO و ایسکمی بر روی تغییرات بیان ناقلین اسیدهای آمینه‌ی تحریکی (EAATs) و سطح فعالیت NF-kB مورد سنجش قرار گرفت. یافته‌ها، پیش‌شرطی‌سازی با HO و ایسکمی متناوب باعث کاهش میزان نقص نورولوژیک و حجم سکنه‌ی مغزی می‌شود. پیش‌درمان با HO متناوب باعث افزایش بیان آنزیم تبدیل‌کننده‌ی TNF-a 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 آنزیم تبدیل‌کننده‌ی TNF-a و سطح فعالیت NF-kB انجام می‌دهد.

واژگان کلیدی: هیپیرکسی نورموباریک، تحمل به ایسکمی مغزی، سکنه‌ی مغزی، ناقلین اسیدهای آمینه‌ی تحریکی، سطح فعالیت NF-kB

مقدمه

مغز را در برابر استرس‌های دیگر حاصل از همین تحریکات آسیب‌رسان (تحمل) یا دیگر تحریکات آسیب‌رسان (تحمل

تحریکات آسیب‌رسان در دوزهای پایین و کم، البته زیر آستانه‌ی آسیب‌رسان به سلول، پاسخ سازشی القا می‌کند که

* دکترای تخصصی فیزیولوژی، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی زنجان

** دکترای تخصصی فیزیولوژی، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی زنجان

متقابل) حفاظت می‌کند (۱). در بین استرس‌های مختلف، هیپوکسی (۲)، ایسکمی (۳)، تشنج (۴)، آنوکسی (۵)، افسردگی منتشر (۶)، گرما (۷)، استرس اکسیداتیو (۸)، تیمار با اسیدهای چرب اشباع نشده (۹) و مهارکننده‌های فسفوریلاسیون اکسیداتیو (۱۰) فرآیند تحمل مغز در برابر ایسکمی (کامل یا کانونی) را القا می‌کنند. چندین گزارش وجود دارد که هیپرکسی نیز باعث بروز تحمل به ایسکمی می‌شود (۱۱، ۱۲).

پیش‌شرطی‌سازی برای ایجاد تحمل به ایسکمی پدیده‌ای است که در آن دوره‌های کوتاه آسیب خفیف زیرکشنده، حفاظت قدرتمندی در برابر آثار زیان‌آور ایسکمی کشنده، طولانی و متوالی القا می‌کند (۱۳). تحریکات زیرکشنده که شالوده‌ی واقعی پیش‌شرطی‌سازی را می‌سازد کاملاً متنوع است که در بالا ذکر شد. به این ترتیب، محدوده‌ی تحمل به ایسکمی وسیع است. آثار مفید پیش‌شرطی‌سازی اولین بار در قلب نشان داده شد. اکنون روشن شده است که پیش‌شرطی‌سازی می‌تواند تحمل به ایسکمی را در اندام‌ها و دستگاه‌های مختلف از جمله مغز، قلب، کبد، روده‌ی کوچک، عضله‌ی اسکلتی و ریه‌ها القا کند (۱۴-۱۶).

فاکتور تومور نکروز-آلفا (Tumor Necrosis Factor- α [TNF- α]) در مکانیسم‌های حفاظت مغزی در برابر آسیب‌های حاصل از ایسکمی اخیراً به مقدار زیادی مورد تأکید قرار گرفته است (۱۷-۲۰). با در نظر گرفتن نقش حفاظت مغزی TNF- α ، برخی مطالعات نشان داده‌اند که TNF- α به عنوان یک میانجی کلیدی در پیش‌شرطی‌سازی ایسکمی (Ischemic Preconditioning [IPC]) عمل می‌کند (۲۱، ۲۲) TNF- α به واسطه‌ی پروتئاز متصل به غشا به حالت محلول رها می‌شود. این آنزیم به عنوان پروتئین غیرجامعیت‌دهنده (دیس‌اینتگرین) و متالوپروتئیناز (A Disintegrin and Metalloproteinase [ADAM]) موسوم به آنزیم تبدیل‌کننده‌ی TNF- α (TACE/ADAM)

عمل می‌کند (۲۳). هم‌چنین، محققین اخیراً نشان داده‌اند که بعد از پیش‌شرطی‌سازی به ایسکمی به واسطه‌ی برخی عوامل مانند القای محرومیت اکسیژن و گلوکز در شرایط *in vitro* آنزیم (TNF- α Converting Enzyme [TACE]) دچار تنظیم افزایشی می‌شود و نقش حیاتی در حفاظت مغزی ایفا می‌کند (۲۴). نتایج نشان می‌دهد که افزایش القای محرومیت اکسیژن و گلوکز (Oxygen Glucose Deprivation [OGD])، گلوتامات خارج سلولی را در محیط‌های کشت که در معرض پیش‌شرطی‌سازی به ایسکمی قرار می‌گیرند پایین می‌آورد. این اثر توسط BB3103 (مهارکننده‌ی TACE) و آنتی TNF- α بلوک می‌شود و با انکوباسیون قبلی با TNF- α تقلید می‌گردد (۲۵). بنابراین درگیری آنزیم TACE و TNF- α در پیش‌شرطی‌سازی حاصل از محرومیت اکسیژن و گلوکز در شرایط *in vitro* به اثبات رسیده است (۲۶ و ۲۱، ۱). اما اثر هیپرکسی بر میزان بیان ژن آنزیم تبدیل‌کننده‌ی TNF- α و سطح سرم TNF- α در شرایط *in vitro* و *in vivo* هنوز ناشناخته است. در این مطالعه اثر هیپرکسی نورموباریک متناوب به تنهایی و هیپرکسی توأم با ایسکمی بر تغییرات بیان آنزیم تبدیل‌کننده‌ی TNF- α (TACE) و فعالیت NF- κ B مورد بررسی قرار می‌گیرند.

روش بررسی

گروه بندی حیوان آزمایشگاهی: موش‌های صحرایی اسپراگو-دالی ۲۵۰ تا ۳۵۰ گرم به طور تصادفی به دو گروه حاوی ۲۰ حیوان تقسیم گردید. گروه اول در درون جعبه‌ی اکسیژن با غلظت بالای ۹۰ درصد تحت عنوان شرایط هیپرکسی قرار داده شدند. به طوری که به صورت متناوب (۴ ساعت در روز به مدت ۶ روز) در معرض اکسیژن بالای ۹۰ درصد قرار گرفتند (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

(Atrial Blood Gases [ABG]) در هر دو گروه انجام شد.

ایجاد مدل سکته‌ی مغزی (انسداد شریان مرکزی مغز): موش‌ها بعد از توزین با داروی کلرات‌هیدرات (مرک، آلمان) (۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن) هوش‌بری می‌شدند. جراحی مدل‌سازی MCAO مطابق دستورالعمل لونگا و همکارانش انجام شد (۲۵). به طور خلاصه، تحت جراحی میکروسکوپی، یک نخ بخیه‌ی نایلون از طریق تنه شریان کاروتید خارجی (External Carotid Artery [ECA]) وارد رگ شد و تا رسیدن به شریان سربرال قدامی (Anterior Cerebral Artery [ACA]) از میان شریان کاروتید داخلی (Internal Carotid Artery [ICA]) با تریگولپلاتین بسته ادامه داده شد. در اثر تماس نخ بخیه و ACA جریان خون از هر طرف به شریان سربرال میانی (Middle Cerebral Artery [MCA]) 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 اندازه‌گیری و میزان دما در حوالی ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد حفظ شد.

ارزیابی رفتاری حاصل از سکته: معاینه‌های نورولوژیک بعد از ۲۴ ساعت انجام و در طول ۲۴ ساعت بعد از شروع انسداد تا قربانی شدن حیوان مراقبت‌های ویژه انجام شد. یافته‌های نورولوژیکی در ۵ مقیاس دسته‌بندی شدند:

شماره‌ی صفر: هیچ‌گونه عارضه‌ی نورولوژیک نشان نمی‌دادند؛ شماره‌ی یک: نارسایی کامل در انتهای پنجه‌های جلویی، که یک نقص نورولوژیک کانونی خفیف در نظر گرفته می‌شود. شماره‌ی دو: به چپ چرخیدن، نقص نورولوژیک کانونی متوسط. شماره‌ی سه: افتادن به سمت چپ نقص کانونی شدید هستند و موش‌های شماره‌ی چهار

۲۱ درصد قرار گرفتند (InRA). حیوان‌ها سپس به مدت ۲۴ ساعت در هوای اتاق (۲۱ درصد) قرار داده شدند سپس هر کدام از این گروه‌ها به سه زیرگروه تقسیم شدند. زیرگروه‌های اول به مدت ۶۰ دقیقه تحت جراحی انسداد شریان مرکزی (MCAO) قرارگرفته و ۲۴ ساعت بعد از لحاظ نقص‌های حرکتی نورولوژیک مورد مطالعه قرار گرفتند. زیرگروه‌های دوم به عنوان گروه شم پروتوکل آزمایشی گروه اول را دریافت کردند با این تفاوت که جراحی بدون MCAO در این حیوانات صورت گرفت. زیرگروه‌های سوم به عنوان گروه دست نخورده پروتوکل آزمایشی گروه اول را دریافت کردند با این تفاوت که هیچ‌گونه جراحی در آن‌ها صورت نگرفت. این دو گروه برای بررسی اثر خالص پیش‌شرطی‌سازی با هیپرکسی نورموباریک متناوب بر میزان بیان آنزیم تبدیل‌کننده‌ی TNF-a (TACE) و سطح Phospho-IκBα طراحی شده بودند. برای ارزیابی سطح Phospho-IκBα در زیرگروه‌های دوم و سوم، بلافاصله و ۴۸ ساعت بعد از پیش‌درمان با هیپرکسی نورموباریک نمونه‌گیری انجام شد.

جعبه‌ی هیپرکسی: ۹ موش صحرایی در داخل یک جعبه که تمامی درزهای آن به طور کامل گرفته شده است در ابعاد (۳۰ × ۳۵ × ۶۵) با دو مجرای ورودی و خروجی قرار داده شدند. ماده‌ای به نام آهک سوددار (soda lime) (جاذب دی‌اکسیدکربن) در زیر جعبه قرار داده شد تا دی‌اکسیدکربن تولیدی را جذب کند. به این ترتیب، امکان تغییر غلظت گاز داخل جعبه به حداقل رسید. اکسیژن خالص (۹۵ درصد = FI_{O_2}) یا هوای اتاق در میزان ۳ لیتر در دقیقه برای تیمار جانوران به جعبه‌ی حاوی موش‌ها متصل شد. برای افزایش دقت آزمایش یک الکتروود سنجش اکسیژن نیز در کنار جعبه تعبیه شد تا غلظت اکسیژن داخل جعبه را اندازه‌گیری کند. سنجش گازهای شریانی

به طور خود بخودی نمی‌توانند راه بروند و سطح هوشیاری پایین دارند.

ارزیابی حجم سکنه‌ی مغزی: بعد از قربانی کردن موش‌ها با کلرال‌هیدرات (۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن)، سر آن‌ها جدا و به سرعت مغزها خارج و در سالیین ۴ درجه به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شدند. هشت برش به ضخامت ۲ میلی‌متر به صورت کروئال به واسطه‌ی دستگاه ماتریکس مغز تهیه شد که شروع آن‌ها از پیاز بویایی بود. برش‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در محلول ۲ درصد ۳،۲ و ۵ تری‌فنیل‌تترازولیوم‌کلراید نگهداری شده سپس با دوربین دیجیتال (نوکیا ۶۶۳۰) که قابل اتصال به کامپیوتر بود تصویربرداری شدند. بعد از انتقال تصاویر به کامپیوتر به واسطه‌ی نرم‌افزار Image Tools مساحت نواحی سفید و قرمز به ترتیب به عنوان نواحی آسیب دیده و سالم اندازه‌گیری شدند. حجم نواحی آسیب دیده و سالم برش‌ها از طریق محاسبه‌ی حاصل ضرب مساحت نواحی مذکور برش‌ها در ضخامت ۲ میلی‌متر برش به دست آمد و سپس به واسطه‌ی معادله‌ی زیر حجم اصلاح شده‌ی ناحیه‌ی آسیب دیده محاسبه شد (۲۶):

- حجم نیمکره‌ی چپ = حجم اصلاح شده‌ی ناحیه‌ی آسیب‌دیده (حجم ناحیه‌ی آسیب‌دیده - حجم نیمکره‌ی راست)

آنالیز وسترن بلات آنزیم تبدیل‌کننده‌ی TNF- α : ابتدا برای هموژن کردن بافت مغز بافر هموژن را به صورت زیر آماده می‌کردیم. بافر حاوی ۳۲۰ میلی‌مولار سوکروز (مرک، آلمان)، یک میلی‌مولار دی-آل دی تیوتریتول، ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مهارکننده‌ی تریپسین‌سوییبن (مرک، آلمان)، ۲٪ SDS (مرک، آلمان) ۱۰۰ میکرومولار و ۱۰-۱ فناترولین (مرک، آلمان)، یک درصد PMSF و ۵۰ میلی‌مولار تریس (بوهرینگر - مانهم، آلمان)، بود که در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد با HCl به pH=۷ رسانده شد (۳). در

مرحله‌ی بعد حدود ۱۵۰ میلی‌گرم از بافت مغز (۴۸ ساعت بعد از پایان هیپرکسی پیوسته و متناوب یا نورموکسی) از ناحیه‌ی همسو با ناحیه‌ی آسیب مغزی را جدا کردیم. بافت جدا شده را در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد در ۴ حجم حاوی بافر هموژن قرار دادیم (۲۳) سپس به واسطه‌ی دستگاه سونیکاتور به مدت ۱۰ ثانیه، ۰/۵ دور در ثانیه و دامنه ۶۰ درصد بافت مغزی را هموژن کردیم. پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه بافر حاوی محلول هموژن را با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیفریوژ نمودیم. سپس، ۱۰ میکرولیتر محلول هموژن را با بافر نمونه 2x مخلوط کرده و به مدت ۵ دقیقه جوشاندیم. ۴۰ میکروگرم از آن را روی چاهک‌های ژل لود کردیم، هم‌چنین نردبان وزن مولکولی پروتئینی (SM0671، فرمتاز) به اندازه‌ی ۵ میکرولیتر در یکی از چاهک‌ها لود شد. پروتئین‌ها بر اساس اندازه در SDS-PAGE ۱۰ درصد جدا شدند.

قبل از اضافه‌کردن آنتی‌بادی پروتئین‌های موردنظر، غشای PVDF توسط ماده‌ی بلوک‌کننده (آمرشام، GE Healthcare) به مدت یک ساعت بلوک شد. پروتئین‌ها بر روی غشای PVDF با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال اختصاصی علیه آنزیم تبدیل‌کننده‌ی TNF- α (Prosci-incorporated) با رقت ۱:۲۰۰۰ حاصل از بز یا با آنتی‌بادی اختصاصی علیه بتا-اکتین (Prosci-incorporated) به مدت یک ساعت انکوبه شدند. آنزیم تبدیل‌کننده‌ی TNF- α و بتا-اکتین به واسطه‌ی آنتی‌بادی اختصاصی اولیه شناسایی شدند و به آن‌ها اتصال یافتند سپس آنتی‌بادی‌های ثانویه اختصاصی خرگوش متصل به (Horse Radish Peroxidase [HRP]) (دانمارک، داکوساتیومیشن) برای شناسایی آنتی‌بادی‌های علیه آنزیم تبدیل‌کننده‌ی TNF- α و بتا-اکتین با رقت ۱/۱۰۰۰۰ مورد استفاده قرار گرفت. انکوباسیون آنتی‌بادی ثانویه به مدت یک ساعت در دمای اتاق صورت گرفت. بعد از شستشوی غشای

انکوبه شد. بعد از شستشو Strep-HRP با رقت ۱:۱۰۰۰ اضافه و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه می‌شد. بعد از شستشو، محلول سوبسترا به چاهک‌ها اضافه و در فاصله ۲ تا ۱۰ دقیقه بعد از افزودن سوبسترا میزان نور تولیدی توسط لومی‌ناتور (چین، کمولومیناسانس ایمونواسی آنالیزر) اندازه‌گیری شد.

تحلیل نتایج و روش‌های آنالیز آماری: داده‌ها به صورت میانگین + انحراف معیار بیان شده است. غلظت Phospho-IkBa، میزان بیان آنزیم تبدیل‌کننده TNF- α ، گازهای خونی شریانی و حجم آسیب بافتی از طریق تست آنوای یک طرفه و T-Test محاسبه شده‌اند. امتیاز نقص‌های نورولوژیک با استفاده از Mann-Whitney U Test آنالیز شده است. $P < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها

پارامترهای شرایط آزمایش: براساس ارزیابی‌های آزمایش گازهای خونی شریانی (ABG) فشار اکسیژن شریانی در شرایط هیپرکسی بسیار بالاتر از فشار اکسیژن شریانی در شرایط نورموکسی است (جدول ۱).

جدول ۱: وضعیت گازهای خونی 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±۰/۰۳	۴۱/۱۶±۱/۴	۹۲/۸±۳/۳	۱/۶۲±۰/۰۹
HO متناوب	۷/۳±۰/۰۲	۳۹/۲±۱/۹	۳۵۱/۱±۱۷/۶	۱/۳۷±۰/۰۱

قابل ملاحظه کاهش می‌یابد. میانه‌ی امتیازهای نقص نورولوژیک در گروه‌های هیپرکسی نورموباریک متناوب و نورموکسی نورموباریک متناوب و در جدول ۲ نشان داده شده است.

PVDF مخلوطی از سوبسترای A, B (آمرشام بیوسانسیس ECL) در تاریکی بر روی غشا اضافه می‌شد و در اثر واکنش آن‌ها با HRP نور تولید شد. آن گاه فیلم حساس رادیولوژی را به مدت ۱ دقیقه بر روی بلات قرار دادیم تا فیلم رادیولوژی را متأثر سازد. به این ترتیب وجود پروتئین آشکار شد.

آزمایش الیزا Phospho-IkBa: بعد از نمونه‌گیری مغزی، Phospho-IkBa به واسطه‌ی کیت اندازه‌گیری Phospho-IkBa براساس دستورالعمل کیت انجام شد (بیوکمیکال، آکسیس). به طور خلاصه، ۵ میلی گرم از بافت مغزی ناحیه‌ی همسو در نیمکره‌ی غیرایسکمی در محلول بافر فسفات سرد در دمای ۴ درجه جدا و دو بار به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس حجم معادلی از بافر لیزکننده به حجم بافت اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه انکوبه شد. آن گاه، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول سوپرناتانت برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین جمع‌آوری شد. محلول سلول‌های لیز شده تا غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر در بافر بلوک‌کننده رقیق شد. سپس آنتی‌بادی آشکارکننده در محلول بلوک‌کننده با رقت ۱:۲۰۰ اضافه و به مدت یک ساعت در دمای اتاق

آثار هیپرکسی نورموباریک متناوب بر امتیازهای نقص نورولوژیک: میانه‌ی امتیازهای نقص نورولوژیک (Nuerologic Defect Score [NDS]) به واسطه‌ی قرارگیری در معرض هیپرکسی نورموباریک به طور

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

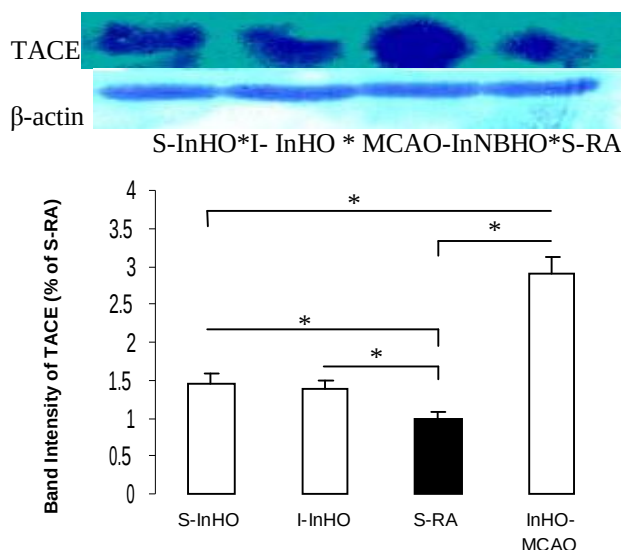
شماره	گروه‌های آزمایشی	تعداد نقص‌های نورولوژیک در هر گروه						تعداد کل	میان	نتایج آماری (مقدار P)
		۰	۱	۲	۳	۴	۵			
۱	RA متناوب	۰	۲	۴	۲	۰	۰	۸	۲	۱:۲ معنی دار ($P < 0.05$)
۲	HO متناوب	۳	۳	۱	۰	۰	۰	۷	۰	

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

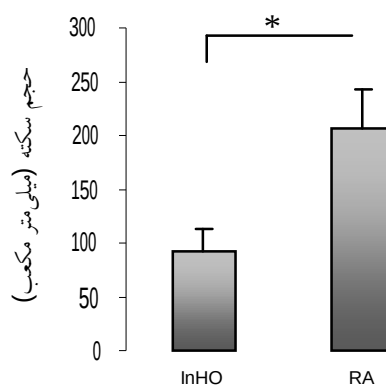
در موش‌هایی که به واسطه‌ی قرارگرفتن در معرض هیپرکسی هیچ‌گونه نقص نورولوژیک مشاهده نشده بود، با تزریق اوانس آبی، این رنگ در ناحیه‌ی مرکزی سکتی مشاهده شد. این مدرک نشان می‌دهد که در کلیه‌ی موش‌های مذکور انسداد شریان مرکزی مغز صورت گرفته ولی به دلیل بروز پدیده‌ی تحمل به ایسکمی القایی هیپرکسی به ویژه در ناحیه‌ی پنومبرا استحکام سد خونی - مغزی افزایش یافته است.

اثر هیپرکسی نوروموباریک متناوب بر حجم سکتی مغزی؛ شکل ۱ نشان می‌دهد که هیپرکسی نوروموباریک متناوب (InHO) در مقایسه با نورموکسی نوروموباریک (RA) باعث کاهش حجم آسیب بافتی می‌شود.

حاصل از هیپرکسی را اثبات می‌کند (شکل ۱). اثر هیپرکسی نوروموباریک متناوب و هیپرکسی نوروموباریک متناوب توأم با ایسکمی بر بیان ژن آنزیم تبدیل کننده‌ی $TNF-\alpha$ ؛ شکل ۲ نشان می‌دهد که هیپرکسی نوروموباریک متناوب (S-InHO) در مقایسه با نورموکسی نوروموباریک (S-RA) باعث افزایش بیان ژن آنزیم تبدیل کننده‌ی $TNF-\alpha$ می‌شوند. اثر توأم هیپرکسی نوروموباریک متناوب و ایسکمی (MCAO-InHO) در مقایسه با نورموکسی نوروموباریک باعث افزایش بیان ژن آنزیم تبدیل کننده‌ی $TNF-\alpha$ شده است. تفاوت آماری گروه‌های مذکور معنی دار است ($P < 0.01$) (شکل ۲).



شکل ۲: آنالیز وسترن بلات ناقل گلو تامات شماره‌ی ۳ در گروه شم (S) و دست نخورده (I) هیپرکسی نوروموباریک متناوب به تنهایی (InHO) و هیپرکسی نوروموباریک متناوب توأم با ایسکمی (MCAO-InHO) در مقایسه با نورموکسی نوروموباریک (RA).

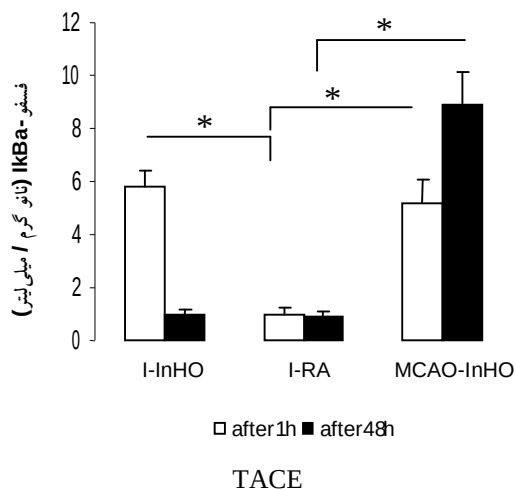


شکل ۱: حجم آسیب بافتی حاصل از سکتی مغزی در گروه‌های آزمایشی هیپرکسی نوروموباریک متناوب (InHO) و هوای اتاق (RA).

تفاوت آماری گروه‌های هیپرکسی نوروموباریک متناوب (InHO) نسبت به گروه شم نورموکسی نوروموباریک معنی دار است ($P < 0.01$). کاهش حجم آسیب بافتی و نقص‌های نورولوژیک اثر پدیده‌ی تحمل به ایسکمی

محدوده‌ی طبیعی نگاه داشته می‌شد. البته، در گروه‌های هیپرکسی به علت غلظت بالای اکسیژن، محتوی اکسیژن افزایش و فرکانس تنفس کاهش می‌یافت. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که هیپرکسی نورموباریک متناوب 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 پدیده‌ی تحمل به ایسکمی بعد از ۲۴ ساعت هیپرکسی نورموباریک پیوسته را گزارش کرده‌اند. هم چنین گزارش کرده‌اند که هیپرکسی نورموباریک پیوسته کم‌تر از ۲۴ ساعت پدیده‌ی تحمل به ایسکمی را نشان نمی‌دهند و با تزریق رفتگرهای (Reactive Oxygen Species [ROS]) دقیقاً قبل از ۲۴ ساعت هیپرکسی نورموباریک پیوسته پدیده‌ی تحمل به ایسکمی نشان داده نشده است (۱۱). نتایج این پژوهش با نتایج ژانگ و همکارانش همخوانی دارد. بنابراین، هیپرکسی نورموباریک متناوب احتمالاً با افزایش ROS مسیر پیام‌رسانی سلولی پیش‌شرطی سازی ایسکمی را به راه می‌اندازد. 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 پدیده‌ی تحمل به ایسکمی را در مغز نشان نمی‌دهد (۱۱). دونگ و همکارانش نشان داده‌اند که پیش‌درمان با هیپرکسی نورموباریک (۲/۵ اتمسفر) و هیپرکسی نورموباریک به صورت یک ساعت در روز به مدت ۵ روز باعث ایجاد پدیده‌ی تحمل به ایسکمی در نخاع خرگوش شده است (۱۲). نتایج پژوهش حاضر نتایج دونگ و همکارانش را تأیید 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

اثر هیپرکسی نورموباریک متناوب و پیوسته و هیپرکسی نورموباریک متناوب توأم با ایسکمی بر غلظت **Phospho-IkB α** : شکل ۳ نشان می‌دهد که هیپرکسی نورموباریک متناوب (I-InHO) بلافاصله بعد از پیش‌درمان، در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (I-RA) باعث افزایش غلظت فسفو-IkB α می‌شوند. اثر توأم هیپرکسی نورموباریک متناوب و ایسکمی (MCAO-InHO) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک و هیپرکسی نورموباریک متناوب باعث افزایش غلظت فسفو-IkB α شده است ($P < 0/01$). هیپرکسی نورموباریک متناوب (I-InHO) بعد از ۴۸ ساعت از پیش‌درمان، در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (I-RA) بر تغییر غلظت **Phospho-IkB α** معنی‌دار نیست. تفاوت آماری گروه‌های مذکور و در مقایسه با نورموکسی نورموباریک معنی‌دار است ($P < 0/01$) (شکل ۳).



شکل ۳: آنالیز الیزا فسفو-IkB α در گروه هیپرکسی نورموباریک متناوب به تنهایی (InHO) و هیپرکسی نورموباریک متناوب توأم با ایسکمی (MCAO-InHO) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (RA).

بحث

مدل MCAO به واسطه‌ی نخ بخیه ایجاد می‌شود و یک مدل مطمئن و قابل تکرار در مدل‌های حیوانی با سکنه‌ی مغزی است (۲۵، ۲۶). شرایط فیزیولوژیک در طی آزمایش در

این پژوهش نشان می‌دهد که هیپرکسی نورموباریک متناوب باعث افزایش بیان آنزیم تبدیل کننده $TNF-\alpha$ می‌شود. همچنین اثر هیپرکسی نورموباریک متناوب توأم با ایسکمی نسبت به هیپرکسی نورموباریک متناوب به تنهایی بر افزایش بیان آنزیم تبدیل کننده $TNF-\alpha$ بیشتر بوده است. به عبارت دیگر، ایسکمی و هیپرکسی نورموباریک در میزان بیان ژن مؤثر است. تاکنون گزارشی مبنی بر ایجاد تحمل به ایسکمی به واسطه‌ی افزایش بیان آنزیم تبدیل کننده $TNF-\alpha$ از طریق هیپرکسی در مغز منتشر نشده است. اما نشان داده شده است که در اثر پیش‌شرطی‌سازی ایسکمی از طریق دوره‌های کوتاه ایسکمی در شرایط *in vitro* (۲۹، ۲۸) میزان بیان آنزیم تبدیل کننده $TNF-\alpha$ افزایش می‌یابد. در شرایط *in vivo* نیز نشان داده شده است (۲۹) که میزان بیان آنزیم تبدیل کننده $TNF-\alpha$ در اثر دوره‌های کوتاه ایسکمی تغییر می‌کند و با بیان ناقلین گلوتامات مرتبط است. از طرف دیگر، یاماشیتا و همکارانش در شرایط *in vivo* نقش ناقلین گلوتامات نوع ۴ و ۱ ($EAAT1/GLAST$ و $EAAT4$) را در سلول‌های پورکینز مخچه موش جهش‌یافته بعد از آسیب حاصل از ایسکمی مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که موش‌های جهش‌یافته ناقل گلوتامات نوع ۱ نسبت به موش‌های جهش‌یافته ناقل گلوتامات نوع ۴ آسیب‌پذیرتر بودند (۳۰). نتایج مزبور نشان می‌دهد که ناقل گلوتامات نوع ۱ می‌تواند نقش مهمی در جلوگیری از بروز آثار سمی حاصل از تحریک داشته باشد. بنابراین، یکی از عوامل کاهش میزان نقص‌های نورولوژیک و ایجاد پدیده‌ی تحمل به ایسکمی افزایش بیان آنزیم تبدیل کننده $TNF-\alpha$ و به دنبال آن افزایش بیان ناقلین گلوتامات است. همچنین گزارش شده است که میزان ناقل گلوتامات نوع ۱ به واسطه‌ی مهار گیرنده‌ی $TNF-\alpha$ تغییر پیدا نمی‌کند (۲۹). این مطلب نشان می‌دهد که افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۱ در مسیر پیام‌رسانی $TNF-\alpha$ قرار ندارد. نتایج این پژوهش

نشان می‌دهد که هیپرکسی نورموباریک متناوب به تنهایی و توأم با ایسکمی باعث افزایش سطح فسفو- $IkB\alpha$ می‌شود که به این ترتیب نشانگر افزایش سطح فعالیت $NF-kB$ است (۳۱). تاکنون گزارشی مبنی بر ایجاد تحمل به ایسکمی به واسطه‌ی افزایش سطح فعالیت $NF-kB$ از طریق هیپرکسی در مغز منتشر نشده است. اما نشان داده شده است که در اثر پیش‌شرطی‌سازی ایسکمی از طریق دوره‌های کوتاه ایسکمی در شرایط *in vitro* سطح فعالیت $NF-kB$ افزایش می‌یابد (۱). همچنین $TNF-\alpha$ بیان $EAAT2/GLT1$ را افزایش می‌دهد و گرفتن گلوتامات را بعد از تجویز LPS بالا می‌برد (۳۲). علاوه بر این $TNF-\alpha$ بیان و عملکرد ناقلین مواد مختلف را می‌افزاید بنابراین، افزایش سطح فعالیت $NF-kB$ می‌تواند به عنوان یکی از عوامل ایجادکننده‌ی پدیده‌ی تحمل به ایسکمی مطرح باشد. یافته‌های این تحقیق نیز با یافته‌های محققین مذکور همخوانی دارد. 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 $(TACE/TNF-\alpha)$ مرتبط باشد (۱، ۲۹). نتایج این تحقیق نیز نشان می‌دهد که تغییرات سطح فعالیت $NF-kB$ و میزان بیان آنزیم تبدیل کننده $TNF-\alpha$ رابطه‌ی مستقیم دارند. مطالعات نشان می‌دهد که اکسیژن‌رسانی مجدد منجر به انفجار تولید ROS می‌شود (میتوکندری به عنوان منبع تولید و حسگر ROS محسوب می‌شود) (۳۲). افزایش ROS حاصل از جریان خون مجدد باعث افزایش آسیب بافتی شده و موجب افزایش تولید $TNF-\alpha$ و سایر سیتوکین‌ها می‌شود. به این ترتیب $TNF-\alpha$ از طریق گیرنده‌ی خود احتمالاً به واسطه‌ی فعال‌سازی $NF-kB$ میزان بیان ژن ناقلین گلوتامات را در سلول‌های عصبی افزایش می‌دهد (۱، ۲۹). علاوه بر این ژن‌های دیگری در مراحل پیش‌شرطی‌سازی وجود دارد که

ایسکمی بیان آنزیم تبدیل‌کننده‌ی $\text{TNF-}\alpha$ را در درجات مختلف افزایش می‌دهند. این اثر تا حدی می‌تواند تحمل به ایسکمی را میانجی‌گری نماید. ۳- هیپرکسی نورموباریک متناوب و هیپرکسی نورموباریک متناوب توأم با ایسکمی سطح فسفو- $\text{IkB}\alpha$ را در درجات مختلف افزایش می‌دهند. ۴- استفاده از روش هیپرکسی نورموباریک متناوب برای القای پدیده‌ی تحمل به ایسکمی مناسب‌تر 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 مسیر جدیدی در کشف داروها به وجود خواهد آورد که در به حداقل رساندن آسیب‌های نورونی طی ایسکمی مغزی یا پیشروی بیماری‌های مزمن تحلیل عصبی با اثر سمی ناشی از تحریک کمک خواهد کرد.

باعث افزایش روند سازگاری سلول با شرایط سخت ایسکمی می‌شود که شامل افزایش زمان انعقاد خون و نیز افزایش ایتروکین‌ها می‌باشند. ژن‌هایی که روند سازشی برای ایسکمی در بافت را به صورت پدیده‌ی تحمل به ایسکمی به نمایش می‌گذارند عبارتند از: افزایش دهنده‌ها میزان اکسیژن تحویلی، تنظیم‌کننده‌های انرژی و متابولیسم و افزایش‌دهنده‌های توان بقایی سلول و توانایی تکثیر آن (۳۲).

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد: ۱- هیپرکسی نورموباریک متناوب تحمل به ایسکمی را به وجود می‌آورند و باعث کاهش میزان نقص نورولوژیک می‌شوند. ۲- هیپرکسی نورموباریک متناوب و هیپرکسی نورموباریک متناوب توأم با

منابع

- 1- Romera C, Hurtado O, Botella S, 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): 1350–7.
- 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, et al. 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 K(ATP) channels. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999; 19: 1296–308.
- 5- Perez-Pinzon MA, Mumford PL, Rosenthal M, Sick TJ. Anoxic preconditioning in hippocampal slices: role of adenosine. *Neuroscience*. 1996; 75: 687–94.
- 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: 221–6.
- 7- Chopp M, Chen H, Ho KL, et al. Transient hyperthermia protects against subsequent forebrain ischemic cell damage in the rat. *Neurology*. 1989; 39: 1396–8.

- 8- Ohtsuki T, Matsumoto M, Kuwabara K, et al. Influence of oxidative stress on induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *Brain Res.* 1992; 599: 246–52.
- 9- Patel AJ, Honore' E, Maingret F, et al. A mammalian two pore domain mechanogated S-type K⁺ channel. *EMBO J.* 1998; 17: 4283–90.
- 10- Riepe MW, Esclaire F, Kasischke K, et al. Increased hypoxic tolerance by chemical inhibition of oxidative phosphorylation: "chemical preconditioning." *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997; 17: 257–64.
- 11- Zhang X, Xiong L, Hu W, et al. Preconditioning with prolonged oxygen exposure induces ischemic tolerance in the brain via oxygen free radical formation. *Can J Anesth.* 2004; 51: 258–63.
- 12- Dong H, Xiong L, Zhenghua Z, et al. Preconditioning with hyperbaric oxygen and hyperoxia induce tolerance against spinal cord ischemia in rabbits. *Anesthesiology.* 2002; 96: 907-12.
- 13- Downey JM, Cohen MV, Ytrehus K, Liu Y. Cellular mechanisms in ischemic preconditioning: the role of adenosine and protein kinase C. *Ann NY Acad Sci.* 1994; 723: 82–98.
- 14- Baxter GF. Ischaemic preconditioning of myocardium. *Ann Med.* 1997; 29: 345–52.
- 15- Carroll R, Yellon DM. Myocardial adaptation to ischaemia - the preconditioning phenomenon. *Int J Cardiol.* 1999; 68: S93–S101.
- 16- Edwards RJ, Saurin AT, Rakhit RD, Marber MS. Therapeutic potential of ischemic preconditioning. *Br J Clin Pharmacol.* 2000; 50: 87–97.
- 17- Barone FC, Feuerstein GZ. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999; 19: 819–34.
- 18- Shohami E, Ginis I, Hallenbeck JM. Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1999; 10: 119–30.
- 19- Del Zoppo G, Ginis I, Hallenbeck JM, et al. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathol.* 2000; 10: 95–112.
- 20- Hallenbeck JM. The many faces of tumor necrosis factor in stroke. *Nat Med.* 2002; 8: 1363–68.
- 21- Liu J, Ginis I, Spatz M, Hallenbeck JM. Hypoxic preconditioning protects cultured neurons against hypoxic stress via TNF- α and ceramide. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000; 278: C144–C153.
- 22- Wang X, Li X, Erhardt JA, Barone FC, Feuerstein GZ. Detection of TNF- α mRNA induction in ischemic brain tolerance by means of realtime polymerase chain reaction. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000; 20: 15–20.
- 23- Hurtado O, Lizasoain I, Fernandez-Tome P, 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: 576–85.

- 24- Pradillo J, Hurtado O, Romera C, et al. TNF-R1 mediates increased neuronal membrane EAAT3 expression after in vivo cerebral ischemic preconditioning. *J Neurosci*. 2006; 138, 1171–8.
- 25- Longa E, Weinstein P, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989; 20: 84-91.
- 26- Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, et al. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1990; 10(2): 290-3.
- 27- 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.
- 28- Robinson MB. The family of sodium-dependent glutamate transporters: a focus on the GLT-1/EAAT2 subtype. *Neurochem Int*. 1998; 33: 479–91.
- 29- Namura S, Maeno H, Takami S, et al. Inhibition of glial glutamate transporter GLT-1 augments brain edema after transient focal cerebral ischemia in mice. *Neurosci Lett*. 2002; 324: 117–20.
- 30- 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.
- 31- Rosenzweig HL, Minami M, Lessov NS, et al. 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; 27(10): 1663-74.
- 32- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986; 7: 1124 – 36.

Investigation of TNF- α Converting Enzyme and Activity of NF- κ B in Tolerance to Ischemia Induced by Intermittent Normobaric Hyperoxia in Rat Model

Rahnema M, Bigdeli MR

Corresponding Author's Address: Department of Biology, Islamic Azad University of Zanjan, Iran.

Email: meh_rahnama@yahoo.com

Background and objective: Recent studies suggest that intermittent and prolonged normobaric hyperoxia (HO) results in ischemic tolerance to reduce brain injury. In this research attempts were made to see the changes in TNF- α converting enzyme (TACE) and NF- κ B activity following intermittent HO and ischemia preconditioning.

Materials and Methods: The rats were divided into two experimental groups, each consisted of 20 animals. The first group was exposed to 95% inspired HO for 4h/day for 6 consecutive days (intermittent HO; InHO). The second group acting as the control, was exposed to 21% oxygen in the same chamber (normobaric normoxia or room air; RA) continuously for six days (intermittent RA; InRA). Each main group was subdivided to MCAO-operated (middle cerebral artery occlusion), sham-operated (without MCAO), and intact (without any surgery) subgroups. After 24hr, MCAO-operated subgroups were subjected to 60 min of right MCAO. After 24 h reperfusion, neurologic deficit score (NDS) and infarct volume were assessed in MCAO-operated subgroups. Immediately and 48 h after pretreatment, blood sampling for assessment of serum TNF- α levels were subjected. Then, the effect of intermittent HO and ischemia on NF- κ B activity and TACE expression were measured.

Results: Preconditioning with intermittent HO and ischemia decreased NDS and infarct volume. Moreover InHO and MCAO-InHO upregulate TACE and increase NF- κ B activity significantly.

Conclusion: Although further studies are needed to clarify the mechanisms of ischemic tolerance, InHO and ischemia seem to partly exert their effects via increase upregulation of TACE and NF- κ B activity.

Key words: Normobaric hyperoxia, Brain ischemia tolerance, Stroke, TACE, NF- κ B activity