

The effect of prolonged and intermittent normobaric hyperoxia preconditioning on glutathione reductase activity in the rat stroke model

MR Bigdeli* AA Meratan**

* Assistant professor of physiology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

** PhD student, Institute of Biochemistry and Biophysics, Tehran University, Tehran, Iran

*Abstract

Background: Ischemic preconditioning (IPC) is an endogenous phenomenon that can induce ischemic tolerance (IT) in a variety of organs such as brain.

Objective: To investigate the intermittent and prolonged dose of normobaric hyperoxia (HO) on neurologic deficit scores, infarct volume, and glutathione reductase activity.

Methods: this was an experimental study carried out in Shahid Beheshti University of Medical Sciences in Tehran, Iran. A total of 80 rats were initially divided into four main groups. The first two groups were exposed to HO in prolonged (24h; PrHO; 95% O₂) and intermittent (4h×6days; InHO; 95% O₂) groups and the second two groups served as controls and exposed to 21% oxygen in the same chamber (room air, RA) continuously (24h; PrRA) and discontinuously (4h×6days; InRA). Each group was further subdivided into three subgroups. After 24 h, the first subgroup was subjected to 60 minutes middle cerebral artery occlusion (MCAO) followed by 24h of reperfusion. Later, the IT induced by InHO and PrHO, were measured by neurologic deficit scores and infarct volume. The second and third subgroups were marked as sham-operated and intact subgroups for assessing the effect of HO on glutathione reductase activity.

Findings: Our findings indicated that the InHO and PrHO are involved in induction of IT. Pre-treatment with InHO and PrHO reduced the neurologic deficit scores and infarct volume, significantly. The InHO and PrHO caused a significant increase in glutathione reductase activity. The catalase activity of prolonged HO groups was significantly higher than that of intermittent HO groups.

Conclusion: Although further studies are needed to clarify the mechanisms of ischemic tolerance, the InHO and PrHO seem to partly exert their effects via increased glutathione reductase activity.

Keywords: Cerebrovascular Disorders, Normobaric Hyperoxia, Glutathione Reductase, Ischemic, Preconditioning

Corresponding Address: Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Evin, Tehran, Iran.

Email: bigdelimohammadreza@yahoo.com

Tell: +98 21 29902731

Received: 2008/05/06

Accepted: 2008/10/12

اثر پیش‌شرطی‌سازی با هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب بر فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون ردکتاز در مدل سکتة مغزی رت

دکتر محمدرضا بیگدلی*

علی اکبر مرآتان**

* استادیار فیزیولوژی دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی

** دانشجوی دکتری بیوشیمی مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران

آدرس مکاتبه: تهران، اوین، دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی، تلفن ۰۲۱-۲۹۹۰۲۷۳۱ Email: bigdelimohammadreza@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۷/۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۸۷/۷/۲۱

*چکیده

زمینه: پیش‌شرطی‌سازی با ایسکمی یکی از پدیده‌های درون زاد است که می‌تواند توسط عوامل مختلف و از مسیرهای مولکولی متفاوت در بافت‌های مختلف مانند مغز ایجاد شود.

هدف: مطالعه به منظور تعیین اثر پیش‌شرطی‌سازی به واسطه هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب بر فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون ردکتاز در مدل سکتة مغزی رت انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۶ در دانشگاه شهید بهشتی انجام شد. ۸۰ رت در چهار گروه به صورت گروه‌های پیوسته (۲۴ ساعت پیوسته) و متناوب (۴ ساعت در روز به مدت ۶ روز) در معرض هیپرکسی نورموباریک (۹۵٪ اکسیژن) و نورموکسی نورموباریک (هوای اتاق، ۲۱٪ اکسیژن) قرار گرفتند. هر گروه به سه زیرگروه تقسیم شدند. زیرگروه اول، بعد از ۲۴ ساعت تحت جراحی انسداد شریان میانی مغز (MCAO) 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 زیر گروه شم (بدون MCAO) و گروه دست نخورده (بدون جراحی) برای بررسی اثر هیپرکسی نورموباریک بر میزان فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون ردکتاز در نظر گرفته شدند. داده‌ها با آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و من-ویتنی یو تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: هیپرکسی نورموباریک متناوب و پیوسته در القای تحمل به ایسکمی درگیر بودند. پیش‌درمان با هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب نقص‌های عصب‌شناسی بهبود بخشیدند، حجم سکتة مغزی را کاهش دادند و میزان فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون ردکتاز را به طور معنی‌دار افزایش دادند. اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته نسبت به گروه هیپرکسی نورموباریک متناوب بر میزان فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون ردکتاز بیش‌تر بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌ها هیپرکسی نورموباریک ممکن است آثار حفاظت عصبی خود را تا حدی از طریق افزایش میزان فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون ردکتاز نشان دهد.

کلیدواژه‌ها: اختلالات عروقی مغز، نورموباریک هیپرکسی، گلوکوتاتیون ردکتاز، ایسکمی، پیش‌شرطی‌سازی

*مقدمه

ایسکمی کامل یا کانونی را القا می‌کنند.^(۲) چندین گزارش وجود دارد که هیپرکسی نیز باعث بروز تحمل به ایسکمی می‌شود.^(۳)

مطالعه‌های اخیر نشان می‌دهند که افزایش ساخت پروتئین‌های خاص در مغز مانند پروتئین شوک گرمایی ۷۰، Bcl2، ناقلین گلوکوتامات، سوپراکسید دیسموتاز، عوامل آنتی‌آپوپتوز، گونه‌های واکنشی اکسیژن،

تحریک‌های آسیب‌رسان در دوزهای پایین‌تر از آستانه آسیب‌رسان به سلول، پاسخ‌سازشی القا می‌کنند که مغز را در برابر تنش‌های دیگر حفاظت می‌کنند.^(۱) تنش‌های مختلف از قبیل هیپوکسی، ایسکمی، تشنج، آنوکسی، افسردگی منتشر، گرما، تنش اکسیداتیو، تیمار با اسیدهای چرب اشباع نشده و مهارکننده‌های فسفوریلاسیون اکسیداتیو فرایند تحمل مغز در برابر

نسبت بین دی سولفید گلوتاتیون و گلوتاتیون اغلب به عنوان شاخص تنش اکسیداتیو مورد استفاده قرار می گیرند.

لذا، مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر مطالعه به منظور تعیین اثر پیش شرطی سازی به واسطه هیپرکسی نورمواریک پیوسته و متناوب بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردکتاز در مدل سکنه مغزی رت انجام شد.

* مواد و روش ها:

در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۸۶ در دانشگاه شهید بهشتی انجام شد، رت های اسپیراگو-دالی با وزن ۲۵۰ تا ۳۸۰ گرم به طور تصادفی به چهار گروه شامل ۲۰ حیوان تقسیم شدند. شرایط نگهداری از حیوان ها از نظر روشنایی و محیط زندگی استاندارد بود و مطابق مصوبه کمیته اخلاق زیستی دانشگاه شهید بهشتی آزمایش شدند. دو گروه در درون جعبه اکسیژن با غلظت بالای ۹۰ درصد تحت عنوان شرایط هیپرکسی نورمواریک (HO) قرار داده شدند. از این دو گروه، یک گروه به صورت پیوسته (۲۴ ساعت، PrHO) و دیگری به صورت متناوب (۴ ساعت در روز به مدت ۶ روز، InHO) در معرض Ho قرار گرفتند. دو گروه دیگر نیز پیوسته (۲۴ ساعت، PrRA) و متناوب (۴ ساعت در روز به مدت ۶ روز، InRA) در معرض اکسیژن ۲۱ درصد (RA، هوای اتاق) قرار گرفتند. سپس، حیوان ها به مدت ۲۴ ساعت در هوای اتاق قرار گرفتند و هر کدام از این گروه ها به سه زیر گروه تقسیم شدند. زیر گروه های اول به مدت ۶۰ دقیقه تحت جراحی انسداد شریان مرکزی (MCAO) قرار گرفته و ۲۴ ساعت بعد از لحاظ نقص های حرکتی و حجم سکنه مغزی بررسی شدند. زیر گروه های دوم به عنوان گروه شم (S-InHO, S-InRA, S-PrHO, S-PrRA) همان آزمایش های گروه اول را بدون جراحی MCAO دریافت کردند زیر گروه های سوم به عنوان گروه دست نخورده (I-InRA, I-PrHO, I-PrRA, I-InHO) همان

NF-kB و سایتوکین های پیش التهابی تحمل نورو را در برابر ایسکمی افزایش می دهد.^(۵،۴)

یکی از تظاهرات های بالینی آسیب ناشی از ایسکمی در دستگاه عصبی مرکزی (CNS) ادم مغزی ناشی از شکستن سد خونی مغزی است که به واسطه پیش شرطی سازی با هیپرکسی نورمواریک قابل بهبود است.^(۲) آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ادم مغزی را بعد از انواع آسیب ها کاهش می دهد.^(۶) این امر بیان می کند که اکسیژن رادیکالی نقش مهمی در شکستن سد خونی مغزی ایفا می کند. تظاهرات های دیگر آسیب CNS، آسیب مستقیم به سلول های عصبی است که آزادسازی گلوتامات بعد از ایسکمی مغزی را القا می کنند. این آسیب نیز به واسطه پیش شرطی سازی با هیپرکسی نورمواریک از طریق افزایش بیان ناقلین گلوتامات کاهش می یابد.^(۴) پژوهش ها نشان می دهند که تنش خفیف ایسکمی بیان mRNA چندین ژن از قبیل ژن کاتالاز را افزایش می دهد که نیم ساعت بعد از تنش ایسکمی به طور قابل ملاحظه ای افزایش می یابد.^(۸،۷) از طرف دیگر در برخی از آزمایش ها نشان داده شده است که فعال سازی آنزیم های آنتی اکسیدان در سرکوب آسیب های ایسکمی و برقراری مجدد جریان خون دخالت دارند. این امر نشان می دهد که تحمل به آسیب های ایسکمی در اثر افزایش ظرفیت آنزیم آنتی اکسیدان القا می شود.^(۹)

آنزیم های دفاعی آنتی اکسیدان شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD) کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPOX)، و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) هستند. سطوح فعالیت آنها برای اندازه گیری تنش اکسیداتیو در سلول استفاده می شود.^(۱۰)

گلوتامات ردتاز بازگشت گلوتامات به حالت اولیه یعنی از دی سولفید گلوتاتیون به گلوتاتیون (GSSG) از طریق احیای آن را کاتالیز می کند.^(۱۱) دی سولفید گلوتاتیون و گلوتاتیون از لحاظ زیست شناسی به عنوان تیول های داخل سلولی اهمیت زیادی دارند و تغییرات

از طریق رکتوم اندازه‌گیری و در حوالی ۳۷ درجه حفظ می‌شد.

معاینه‌های عصبی بعد از ۲۴ ساعت انجام شد. در طول ۲۴ ساعت بعد از شروع انسداد تا قربانی شدن حیوان، مراقبت‌های ویژه انجام شد. یافته‌های عصبی در ۵ مقیاس دسته بندی شدند: شماره صفر یعنی هیچ گونه عارضه عصبی مشاهده نشود، شماره ۱ (نارسایی کامل در انتهای پنجه‌های جلویی) یک نقص عصبی کانونی خفیف، شماره ۲ (به چپ چرخیدن) نقص عصبی کانونی متوسط، شماره ۳ (افتادن به سمت چپ) نقص کانونی شدید و شماره ۴ عدم توانایی در راه رفتن به طور خود به خودی و کاهش سطح هوشیاری.^(۱۳و۱۲)

بعد از قربانی کردن رت‌ها با کلرال هیدرات (۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن)، سر آنها جدا و مغز به سرعت خارج شدند و در سالیان ۴ درجه به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شدند. هشت برش به ضخامت ۲ میلی‌متر به صورت کرونال به واسطه دستگاه ماتریکس مغز تهیه شدند که شروع آنها از پیاز بویایی بود. برش‌های بافتی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محلول ۲ درصد ۵، ۳ و ۲ و تری فنیل تترازولیوم کلراید نگهداری و سپس با دوربین دیجیتال تصویربرداری شدند. بعد از انتقال تصاویر به کامپیوتر به واسطه نرم افزار (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 محاسبه حاصل ضرب مساحت نواحی مذکور در ضخامت ۲ میلی‌متر برش به دست آمد و سپس به واسطه معادله زیر حجم اصلاح شده ناحیه آسیب دیده محاسبه شد.^(۱۴)

(حجم ناحیه آسیب‌دیده - حجم نیم کره راست) - حجم نیم کره چپ =
حجم اصلاح شده ناحیه آسیب دیده

در رت‌هایی که به واسطه قرار گرفتن در معرض هیپوکسی هیچ گونه نقص عصبی مشاهده نشده بود، با

آزمایش‌های گروه اول را بدون هیچ گونه جراحی دریافت کردند. این دو گروه برای بررسی اثر خالص پیش شرطی‌سازی با هیپوکسی نورموباریک پیوسته و متناوب بر میزان فعالیت آنزیم گلوکوتایون ردکتاز طراحی شده بودند.

تعداد ۹ رت در داخل یک جعبه در ابعاد ۶۵×۳۵×۳۰ سانتی‌متر با دو مجرای ورودی و خروجی قرار داده شدند. ماده‌ای به نام سودا لیم (جاذب دی اکسید کربن) در زیر جعبه قرار داده شد تا دی اکسید کربن تولیدی را جذب کند. بدین ترتیب، امکان تغییر غلظت گاز داخل جعبه به حداقل رسید. اکسیژن خالص (F₁O₂ = ۰/۹۵) یا هوای اتاق به 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 در نظر گرفته شد تا غلظت اکسیژن داخل جعبه را اندازه‌گیری کند. کمیت خون با دستگاه گازهای شریانی (AVL-993) اندازه‌گیری شدند. تعداد تنفس به واسطه باند نشانه حرکت‌های عضله دیافراگم در ناحیه شکم اندازه‌گیری شد.

رت‌ها بعد از توزین، با ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن داروی کلرات هیدرات (مرک، آلمان) بی‌هوش شدند. جراحی مدل سازی MCAO مطابق دستورالعمل لونگا و همکاران انجام شد.^(۱۳) به طور خلاصه، تحت جراحی میکروسکوپی، یک نخ بخیه نایلون از طریق تنه شریان کاروتید خارجی (ECA) وارد رگ می‌شد و تا رسیدن به شریان مغزی قدامی (ACA) از میان شریان کاروتید داخلی ICA با پتریگوپالاتین بسته ادامه داده می‌شد. در اثر تماس نخ بخیه و ACA جریان خون از هر طرف به شریان مغزی میانی (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

مقداری از آنزیم است که باعث اکسید ۱ میکرومول NADPH در یک دقیقه در یک میلی گرم پروتئین شود. سطح فعالیت آنزیم، حجم سکنه مغزی و میزان گازهای خون شریانی با استفاده از آزمون ANOVA و امتیازهای نقص عصبی با استفاده از آزمون من ویتنی تجزیه و تحلیل شدند. مقادیر p کم تر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

* یافته‌ها:

براساس آزمایش گازهای خون شریانی، فشار اکسیژن شریانی در شرایط هیپرکسی بسیار بالاتر از شرایط نورموکسی بود (جدول شماره ۱).

میانه امتیازهای نقص عصبی (NDS) به واسطه قرارگیری در معرض هیپرکسی نورموباریک به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت (جدول شماره ۲). تزریق اوانس آبی نشان داد که در تمام رت‌ها انسداد شریان مرکزی مغز انجام شده، ولی به دلیل بروز پدیده تحمل به ایسکمی القایی هیپرکسی به ویژه در ناحیه پنومبرا (قشر مغز) استحکام سد خونی-مغزی افزایش یافته است.

تزریق اوانس آبی، این رنگ در ناحیه مرکزی سکنه مشاهده می شد.

نمونه‌ها (۱۵۰ تا ۲۰۰ میلی گرم از بافت نیم کره راست) در یک میلی لیتر بافر (۰/۳۲) مول در لیتر ساکاروز، ۱ میلی مول در لیتر EDTA، و ۱۰ نانومول در لیتر تریس هیدروکلرید با $\text{pH} = 7.4$ با هموژنیزر شیشه تفلون هموژن شدند. هموژن با سرعت ۱۳۶۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه سانتیوفوژ شد. سپس سوپر ناتانت برای اندازه گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز جمع آوری شد.^(۱۵) غلظت پروتئین بر اساس روش برادفورد با استفاده از استاندارد آلبومین سرم گاوی اندازه گیری شد.^(۱۶)

فعالیت آنزیم گلوکاتیون ردکتاز به واسطه روش رومرو و همکاران با اندکی تغییر انجام شد.^(۱۷) مخلوط سنجش نهایی حاوی ۰/۱ مولار بافر فسفات پتاسیم، $\text{pH} = 7.0$ ، ۲/۵ میلی مولار GSSG و ۱۲۵ میلی مولار NADPH در دمای ۲۵ درجه در جذب نوری ۳۴۰ نانومتر مخلوط سنجش نهایی در مقایسه با محلول بلانک که حاوی همه مواد غیر از بافت هموژن شده است، اندازه گیری شد. یک واحد آنزیم طبق تعریف

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

گروه های آزمایشی	pH	PCO ₂ (mmHg)	PO ₂ (mmHg)	میزان تنفس (هرتز)
نورموکسی نورموباریک متناوب (InRA)	۷/۴±۰/۰۲	۴۱/۶±۰/۷۵	۹۲/۳±۱/۲۵	۱/۶۱±۰/۰۴
هیپرکسی نورموباریک متناوب (InHO)	۷/۳±۰/۰۱	۳۹/۰±۱/۳	۳۶۰±۷/۴۵*	۱/۳±۰/۰۹
نورموکسی نورموباریک پیوسته (PrRA)	۷/۳۷±۰/۰۲	۴۰/۳±۰/۷۵	۹۳/۱±۰/۸۳	۱/۵۹±۰/۰۸
هیپرکسی نورموباریک پیوسته (PrHO)	۷/۳۵±۰/۰۲	۳۹/۳±۱/۳	۳۵۵±۵/۲*	۱/۲۹±۰/۰۴

*p<۰/۰۰۱

جدول ۲- مقایسه امتیازهای نقص عصبی در گروه های آزمایشی

میانگین	تعداد کل	تعداد نقص های عصبی در هر گروه					گروه های آزمایشی
		۴	۳	۲	۱	۰	
۲	۹	۰	۲	۴	۳	۰	نورموکسی نورموباریک متناوب (InRA)
۰	۹	۰	۰	۱	۳	۵	هیپرکسی نورموباریک متناوب (InHO)
۲	۹	۰	۱	۴	۴	۰	نورموکسی نورموباریک پیوسته (PrRA)
۱	۹	۰	۰	۱	۵	۳	هیپرکسی نورموباریک پیوسته (PrHO)

(مقایسه گروه های ردیف InRA: InHO و PrRA: PrHO معنی دار بود، اما InHO:PrHO معنی دار نبود)

*بحث و نتیجه گیری:

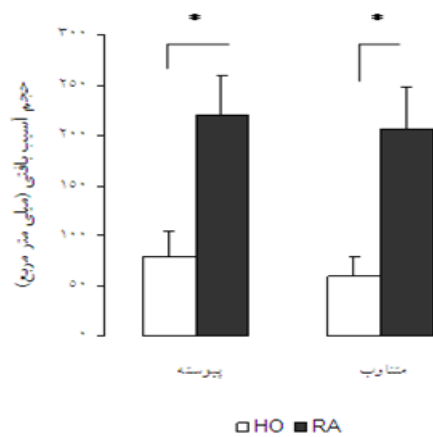
بر اساس نتایج این مطالعه، به نظر می‌رسد هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب می‌تواند نقص عصبی و حجم آسیب مغزی حاصل از سکته مغزی در مدل MCAO را به طور مؤثر کاهش دهند. در حالی که اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته خفیف‌تر است. دمای بدن، گازهای خون، ضربان قلب و فرکانس تنفس طی آزمایش در محدوده طبیعی قرار داشتند. البته در گروه‌های هیپرکسی به علت غلظت بالای اکسیژن، اکسیژن خون افزایش و فرکانس تنفس کاهش یافت.

نتایج پژوهش حاضر با سایر مطالعه‌ها در زمینه تحمل به ایسکمی مطابقت دارد.^{(۱۱) (۱۰)} تحمل به ایسکمی در بافت‌های مغزی بر اساس مدت زمان و مقدار غلظت اکسیژن متفاوت بود. بنابراین، کمیت و کیفیت تجویز اکسیژن در القای تحمل به ایسکمی، عوارض جانبی و مسمومیت‌های آن اهمیت دارد.

هیپرکسی نورموباریک پیوسته آثار جانبی و خواص سمی دارد.^(۱۸) نتایج سایر محققین نشان می‌دهد که هیپرکسی نورموباریک پیوسته کم‌تر از ۲۴ ساعت آثار تحمل به ایسکمی را نشان نمی‌دهد.^(۱۲) گزارش‌های دیگر نشان می‌دهد که قرار گرفتن در معرض اکسیژن ۹۵ درصد به مدت ۲۴ ساعت به احتقان شدید ریوی منجر می‌شود که در آنجا خروج گلبول‌های قرمز خون، 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 به اختلال عملکردی ریه‌ها منجر می‌شود.^(۱۸) مدارک دیگر نشان می‌دهد که پدیده حفاظت قلبی در حیوان‌هایی که در معرض هیپوکسی منقطع (اکسیژن رسانی مجدد و مکرر) قرار می‌گیرند، در مقایسه با حیوان‌هایی که هیپوکسی پیوسته را تجربه می‌کنند قوی‌تر بروز می‌کند.^(۵) بنابراین، با در نظر گرفتن نتایج فوق هیپرکسی متناوب سمیت کم‌تر و آثار تحمل به ایسکمی بیش‌تری القا می‌کند.

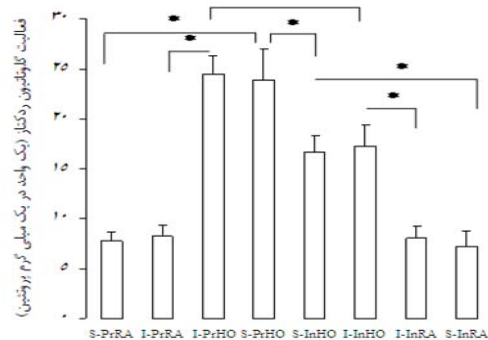
هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب در مقایسه با نورموکسی نورموباریک باعث کاهش حجم آسیب بافتی شد. تفاوت آماری گروه‌های هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب معنی‌دار نبود، ولی تفاوت گروه‌های مذکور نسبت به گروه شم نورموکسی نورموباریک از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < 0/05$) (نمودار شماره ۱).

نمودار ۱- اثر شرایط هیپرکسی نورموباریک (HO) و نورموکسی نورموباریک (RA) متناوب و پیوسته بر روی حجم آسیب بافتی ۴۸ ساعت بعد از پیش درمان



هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب در مقایسه با نورموکسی نورموباریک باعث افزایش سطح فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردکتاز بعد از پایان پیش درمان هیپرکسی شد. اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته بر میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردکتاز به طور معنی‌دار بیش‌تر از اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته بود ($p < 0/01$) (نمودار شماره ۲).

نمودار ۲- فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردکتاز (GR) در گروه‌های مختلف آزمایش و کنترل



برابر تنش اکسیداتیو مقابله می‌کند. فقدان ژن‌های گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز باعث افزایش آسیب‌های نورونی حاصل از مدل سکته مغزی در رت می‌شود. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که افزایش فعالیت کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز باعث کاهش مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، فعال‌سازی آستروسیت‌ها و میکروگلیاها و خروج عناصر ضدالتهابی می‌شود.^(۲۲) از طرف دیگر مطالعه‌ها نشان می‌دهند که فقدان ژنتیکی آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز موجب افزایش آسیب‌های حاصل از ایسکمی و برقراری مجدد جریان خون نمی‌شود، زیرا آثار آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز توسط آنزیم کاتالاز پشتیبانی می‌شود و تا حد زیادی اجازه بروز آثار فقدان آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز را نمی‌دهد.^(۷)

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردکتاز به واسطه هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب افزایش می‌یابد. البته اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته بیش‌تر از هیپرکسی نورموباریک متناوب بود. از طرف دیگر، استفاده از روش هیپرکسی نورموباریک متناوب به علت آثار سمی پایین برای القای پدیده تحمل به ایسکمی مناسب‌تر است. لذا، استفاده از هیپرکسی نورموباریک یا طراحی موادی که قادر به تقلید از آثار هیپرکسی نورموباریک در افزایش فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردکتاز باشند، روش و راهبرد جدیدی در پیدایش دارو‌ها به وجود خواهد آورد که در به حداقل رساندن آسیب‌های نورونی طی ایسکمی مغزی یا حین پیشروی بیماری‌های مزمن تحلیل عصبی درگیر با اثر سمی ناشی از تحریک کمک خواهد کرد.

*مراجع:

1. Romera C, Hurtado O, Botella SH, et al. In Vitro ischemic tolerance involves upregulation of glutamate transport partly mediated by the TACE/ ADAM17-tumor necrosis factor-alpha pathway. *J Neurosci* 2004 Feb 11; 24 (6): 1350-7

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که هیپرکسی در مغز رت به واسطه کاهش حجم آسیب بافتی و امتیاز نقص عصبی، حفاظت عصبی (Neuroprotection) را القا می‌کند. اما هیپرکسی به واسطه آثار دیگری نیز تحمل به ایسکمی را در مغز رت تقویت می‌نماید که عبارتند از: ۱- رگ زایی و افزایش تراکم عروق در واحد حجم ۲- بلوک شدن مولکول چسبان بین سلولی (ICAM-1) و مهار تجمع نوتروفیل‌ها.^(۱۹) بنابراین، هیپرکسی می‌تواند تجمع نوتروفیل‌ها را کاهش دهد و از آسیب مغزی بکاهد. وادا و همکاران نشان دادند که رادیکال‌های آزاد اکسیژن و Bcl-2 که به عنوان مهارکننده آپوپتوز عمل می‌کنند بعد از قرار گرفتن مکرر در معرض هیپرکسی افزایش می‌یابند و باعث افزایش توان زیستی نورونی می‌شوند.^(۴) علاوه بر این، رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌توانند با افزایش TNF- α باعث بروز پدیده تحمل به ایسکمی شوند.^(۲۰) از طرف دیگر، افزایش رادیکال‌های آزاد با افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز خنثی می‌شود و این روند باعث کاهش آسیب القایی هیپوکسی می‌گردد و این فرایند به بهبود عملکرد سد خونی مغزی کمک می‌کند که احتمالاً این عمل را از طریق کاهش عامل رشد عروقی انجام می‌دهد.

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن تبدیل می‌کند. پراکسید هیدروژن می‌تواند به رادیکال هیدروکسیل تبدیل شود.^(۲۱) بنابراین حذف پراکسید هیدروژن برای تکمیل کار سوپراکسید دیسموتاز، کاهش آثار مضر تنش اکسیداتیو حیاتی است. حذف پراکسید هیدروژن را آنزیم کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز انجام می‌دهند. این آنزیم‌ها در بافت مغز وجود دارند. فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز هفت برابر بیش‌تر از آنزیم کاتالاز است. لذا، وجود این آنزیم برای حذف رادیکال هیدروکسیل بسیار اساسی است.^(۲۲) بر خلاف آنزیم کاتالاز که در داخل پراکسیزوم‌ها انجام وظیفه می‌کند، آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در سیتوزول در

2. Bigdeli MR, Hajizadeh S, Froozandeh M, et al. Prolonged and intermittent with normobaric hyperoxia induce different degrees of ischemic tolerance in rat brain tissue. *Brain Res* 2008; 1152: 228-33
3. 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 Anaesth*. 2004 Mar; 51(3): 258-63
4. Bigdeli MR, Hajizadeh S, Froozandeh M, et al. Normobaric hyperoxia induces ischemic tolerance and upregulation of glutamate transporters in the rat brain and serum TNF- alpha level. *Exp Neurol* 2008 Aug; 212(2): 298-306
5. 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 May 15; 153(3): 671-8
6. 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 Jul; 236(1-2): 7-12
7. Noshita N, Sugawara T, Hayashi T, et al. Copper/zinc superoxide dismutase attenuates neuronal cell death by preventing extracellular signal-regulated kinase activation after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci* 2002 Sep 15; 22(18): 7923-30
8. Oh DJ, Kim YH, Kim CH, et al. Pretreatment of hyperbaric oxygenation increase the activation of myocardial antioxidant enzymes and protect the ischemiareperfusion injury of the heart. *Korean J Physiol Pharmacol* 1997; 1: 49-58
9. Das DK, Moraru II, Maulik N, Engelman RM. Gene expression during myocardial adaptation to ischemia and reperfusion. *Ann N Y Acad Sci* 1994 Jun 17; 723: 292-307
10. Kim Y, Chun YS, Park JW, et al. Involvement of adrenergic pathways in activation of catalase by myocardial ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2002 May; 282(5): R1450-8
11. Warner D, Sheng H, and Batinic-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol* 2004 Aug; 207 (pt 18): 3221-31
12. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989 Jan; 20(1): 84-91
13. Bederson JB, Pittter LH, Germano SM, et al. Evaluation of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 1986 Nov-Dec; 17(6):1304-8
14. Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, et al. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow Metab* 1990 Mar; 10(2): 290-3
15. Xia E, Rao G, Van Remmen H, et al. Activities of antioxidant enzymes in various tissues of male Fischer 344 rats are altered by food restriction. *J Nutr* 1995 Feb; 125(2):195-201
16. 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 May 7; 72: 248-54

17. Romero FJ, Romá J, Bosch-Morell F, et al. Reduction of brain antioxidant defense upon treatment with butylated hydroxyanisole (BHA) and Sudan III in Syrian golden hamster. *Neurochem Res* 2000 Mar; 25(3): 389-93
18. Al-Motabagani MA. Histological changes in the alveolar structure of the rat Lung after exposure to hyperoxia. *Ital J Anat Embryol* 2005 Oct-Dec; 110(4): 209-23
19. Helms A, Whelan H, Torbey MT. Hyperbaric oxygen therapy of cerebral ischemia. *Cerebrovasc Dis* 2005; 20(6): 417-26
20. Leong KG, Karsan A. Signaling pathways mediated by tumor necrosis factor alpha. *Histol Histopathol* 2000 Oct; 15(4):1303-25
21. Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu, Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem* 2001 Oct 19; 276(42): 38388-93
22. Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Narasimhan P, et al. Copper-zinc superoxide dismutase prevents the early decrease of apurinic/apyrimidinic endonuclease and subsequent DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 1999 Nov; 30(11):2408-15

Archive of SID